

Titre: Évaluation de l'utilisation des bactériophages anti-staphylococcus aureus pour l'assainissement de surfaces
Title:

Auteur: Gabrielle Barrette
Author:

Date: 2015

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Barrette, G. (2015). Évaluation de l'utilisation des bactériophages anti-staphylococcus aureus pour l'assainissement de surfaces [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/1839/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1839/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: L'hocine Yahia, & Jean Barbeau
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉVALUATION DE L'UTILISATION DES BACTÉRIOPHAGES ANTI-STAPHYLOCOCCUS
AUREUS POUR L'ASSAINISSEMENT DE SURFACES

GABRIELLE BARRETTE

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AOÛT 2015

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

ÉVALUATION DE L'UTILISATION DES BACTÉRIOPHAGES ANTI-STAPHYLOCOCCUS
AUREUS POUR L'ASSAINISSEMENT DE SURFACES

présenté par : BARRETTE Gabrielle

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. ROBERT Étienne, Doctorat Sc., président

M. YAHIA L'Hocine, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. BARBEAU Jean, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. MASSICOTTE Richard, Ph. D., membre

REMERCIEMENTS

Mon parcours de maîtrise fut long et ardu et je voudrais remercier Professeur L'Hocine Yahia de Polytechnique pour le suivi complet tout au long de ce processus. Je tiens aussi à remercier sincèrement le Dr. Barbeau pour son aide tout au long des dernières années. Il a cru en mon potentiel et a su me motiver lors des périodes plus difficiles. Je tiens aussi à remercier Annie Leduc et Daniel Chartrand pour leur support lors des longues heures passées au labo. Je remercie le Dr. Sylvain Moineau et l'équipe du « Centre de référence pour les virus bactériens Félix d'Hérelles » de l'Université Laval pour nous avoir fourni les bactériophages. Finalement, un énorme merci à mes amies et à ma famille qui ont toujours cru en moi, même lorsque je doutais de mes capacités. Je n'y serais pas arrivée sans eux.

RÉSUMÉ

Les infections dues à la bactérie *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (SARM) sont responsables du décès de plusieurs Canadiens chaque année, cette bactérie étant la cause du plus grand nombre d'infections nosocomiales en Amérique. Un des problèmes associé au SARM est sa capacité à survivre sur les surfaces inertes pour des périodes prolongées ce qui augmente le risque de contamination pour les patients. L'objectif de ce mémoire est d'étudier les paramètres de comportement et d'efficacité des phages sur les surfaces solides en vue de développer un détergent à base de bactériophages anti-SARM qui serait sécuritaire pour les employés ainsi que pour les patients en milieu hospitalier. Les deux principales difficultés seront de déterminer la formulation et les conditions optimales d'utilisation des phages de façon à ne pas affecter leur intégrité physique et chimique. Il sera aussi nécessaire de déterminer la quantité de bactériophages à mettre en suspension de manière à avoir une couverture adéquate ainsi qu'un détergent efficace et économique. Les bactériophages sont utilisés depuis plusieurs années en Suisse et en Pologne (surtout dans le domaine vétérinaire), mais peu de désinfectants de ce genre sont sur le marché au Canada et nous croyons fermement que l'utilisation d'un produit de ce genre pourrait faire diminuer les risques d'infections au SARM en milieu hospitalier.

Mots-clés : bactériophages, *Staphylococcus aureus*, infections nosocomiales, hôpitaux, surfaces, désinfection

ABSTRACT

Infections caused by the bacteria methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are responsible for the death of many Canadians each year, making this bacterium the most important cause for nosocomial infections in North America. One of the problems associated with MRSA is its capacity to stay on surfaces for long periods of time, which can increase the risk of infections for patients. The goal of this project is to develop a disinfectant made primarily from anti-MRSA bacteriophages that would be ecological and safe for the employees and the patients in hospitals. There are two major difficulties to overcome: first, it will be important to find the optimal conditions in which to use the bacteriophages. Second, it will be necessary to determine the quantity of phages needed in suspension to make an effective and economical disinfectant. Phages have been used in Poland and in Switzerland (mostly in the veterinary field) but few disinfectants of this kind are on the market in Canada at the moment and we firmly believe that the use of this product could lower the risk of MRSA infections in a hospital setting.

Key words : bacteriophages, *Staphylococcus aureus*, nosocomial infections, hospitals, surfaces, disinfection.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
RÉSUMÉ	IV
ABSTRACT.....	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	XI
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 INFECTIONS NOSOCOMIALES.....	1
1.1.1 DÉFINITION ET STATISTIQUES	1
1.1.2 DÉVELOPPEMENT DES INFECTIONS NOSOCOMIALES ET CONSÉQUENCES	2
1.1.3 PRÉVENTION ET CONTRÔLE	3
1.1.4 BACTÉRIES NOSOCOMIALES ET LES INFECTIONS ASSOCIÉES	6
1.2 PERSISTANCE DES BACTÉRIES ET PRÉVENTION DE LA TRANSMISSION	10
1.3 TECHNIQUES DE DÉCONTAMINATION DE SURFACES : LIMITES ET AVANCEMENTS.....	13
1.3.1 DÉSINFECTANTS CHIMIQUES.....	13
1.3.2 DÉCONTAMINATION PAR PEROXYDE D’HYDROGÈNE	14
1.3.3 INHIBITION DE L’ADHÉSION BACTÉRIENNE PAR APPLICATION DE NANOPARTICULES OU BIOSURFACTANTS	15
1.3.4 SURFACES ANTIMICROBIENNES	17
1.3.5 TRAITEMENT À LA VAPEUR.....	18
1.3.6 PHAGES	19
1.4 BACTÉRIOPHAGES	20
1.4.1 DÉFINITION	20
1.4.2 CLASSIFICATION ET STRUCTURE.....	20
1.4.3 MÉCANISMES D’ACTION	21

1.4.4 STABILITÉ DES BACTÉRIOPHAGES.....	25
1.4.5 AVANTAGES DE L'UTILISATION DES BACTÉRIOPHAGES	26
1.4.6 UTILISATIONS ACTUELLES.....	27
1.4.7 MECANISMES DE DEFENSE DES BACTERIOPHAGES	35
CHAPITRE 2 OBJECTIFS	37
CHAPITRE 3 MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	39
3.1 STABILITÉ DES PHAGES.....	39
3.2 ABSORBANCE DES BACTÉRIES	39
3.3 TITRATION DES PHAGES (GOUTTE ET DILUTIONS).....	40
3.4 ANALYSE DE LA VIABILITÉ DES PHAGES EN SURFACE	41
3.5 ANALYSE DE LA VIABILITÉ DES BACTÉRIES EN SURFACE	42
3.6 TESTS D'INTERACTION ENTRE LES PHAGES ET LES BACTÉRIES SUR DES SURFACES	42
3.6.1 ESSAIS DE TURBIDITÉ	42
3.6.2 INTERACTION SUR MILIEU HUMIDE	43
3.6.3 INTERACTION SUR UN SUBSTRAT SEC	43
3.6.4 EFFET DE LA DILUTION DES PHAGES SUR LEUR EFFICACITÉ SUR LES SURFACES	44
3.7 RÉMANENCE DE L'ACTION DES PHAGES.....	45
CHAPITRE 4 RÉSULTATS.....	46
4.1 PROPRIÉTÉS DES CULTURES BACTÉRIENNES	46
4.1.1 ESTIMATION DE LA CONCENTRATION BACTÉRIENNE.....	46
4.2 COMPORTEMENT DES PHAGES SUITE AU SÉCHAGE.....	46
4.2.1 ANALYSE DE LA VIABILITÉ DES PHAGES SUITE AU SÉCHAGE.....	46
4.3 COMPORTEMENT DES BACTÉRIES SUITE AU SÉCHAGE.....	47
4.3.1 PERSISTANCE BACTÉRIENNE SUR LES SURFACES.....	47
4.4 INTERACTION DES PHAGES AVEC LES BACTÉRIES.....	49
4.4.3 ESSAIS DE TURBIDITÉ	49
4.4.4 ESSAIS SUR ACIER INOXYDABLE ET VÉRIFICATION DE L'EFFET DE L'AJOUT DE CALCIUM.....	50
4.4.5 EFFET DE LA DILUTION DE LA SUSPENSION DE PHAGES SUR L'EFFICACITÉ	51
4.5 POTENTIEL DE RÉMANENCE DES BACTÉRIOPHAGES	53
4.6 STABILITÉ DES PHAGES.....	54

CHAPITRE 5 DISCUSSION	55
5.1 ANALYSE DES RÉSULTATS	55
5.2 LIMITES	61
5.3 APPLICATIONS VISÉES ET ÉTUDES FUTURES	62
5.4 CONCLUSION	64
BIBLIOGRAPHIE	65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1 : Estimation de la concentration bactérienne dans un échantillon avec une absorbance de 0.70 à une densité optique de 600 nm.	46
Tableau 4.2 : Analyse de la viabilité dans le temps du bactériophage K sur une surface d'acier inoxydable	47
Tableau 4.3 : Analyse de la viabilité dans le temps du phage T4 sur une surface d'acier inoxydable	47
Tableau 4.4 : Étude du taux de mortalité des bactéries après différentes périodes de séchage sur une surface d'acier inoxydable.....	48
Tableau 4.5 : Analyse de la turbidité en fonction du temps de contact entre le phage K et <i>S. aureus</i> 1474.....	50
Tableau 4.6 : Effets des phages sur la viabilité de <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i> après décomptes des UFC51	
Tableau 4.7 : Effet de l'ajout de calcium sur l'efficacité des phages K et P68 pour l'infection du <i>S. aureus</i> 1474 et 1049 après 60 minutes de séchage initial et 180 minutes de contact	51
Tableau 4.8 : Mesure de l'efficacité des phages suite à une dilution de la suspension, 60 minutes de séchage initial et 60 minutes de contact	52
Tableau 4.9 : Mesure de l'efficacité des phages suite à une dilution de la suspension, 180 minutes de séchage initial et 60 minutes de contact	52
Tableau 4.10 : Analyse de l'activité antimicrobienne de la suspension de phages suite à une période de séchage (120 minutes) suivi d'un contact avec les bactéries (60 minutes)	53
Tableau 4.11 : Analyse de l'activité antimicrobienne de la suspension de phages suite à une période de séchage (24 heures) suivi d'un contact avec les bactéries (60 minutes)	53

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Bactériophage et ses principales composantes.	21
Figure 1.2 : Cycle lytique et cycle lysogénique des bactériophages	25
Figure 4.1 : Étude du taux de mortalité de trois souches bactérienne en fonction du temps de séchage sur une surface d'acier inoxydable	49

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADVIN	Association des Victimes des Infections Nosocomiales
CAQ	Composés d’ammonium quaternaire
CINQ	Comité sur les infections nosocomiales du Québec
EARSS	« European Antimicrobial Resistance Surveillance System »
ERV	<i>Enterococcus</i> résistant à la vancomycine
FDA	« Food and Drug Administration »
g	gramme
GRAM	Groupe sur la Résistance aux Antimicrobiens
h	heure
IN	infection nosocomiale
INSPQ	Institut National de la Santé Publique du Québec
ml	millilitre
mmol	millimole
min	minute
MSSS	Ministère de la Santé et des Services Sociaux du Québec
OMS	Organisation mondiale de la Santé
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méthicilline
SHEA	Society for Healthcare Epidemiology of America
TP	Température pièce
UFC	unité formatrice de colonie
UFP	unité formatrice de plage de lyse
uL	microlitre

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Infections nosocomiales

1.1.1 Définition et statistiques

Une infection nosocomiale (IN) est définie comme étant une infection acquise par un patient admis à l'hôpital pour une raison autre que l'infection contractée, ou comme une infection contractée par un patient pendant son séjour à l'hôpital et qui n'était pas présente (ou en période d'incubation) au moment de l'admission. (Organisation Mondiale de la Santé [OMS], 2008).

Un problème en croissance

Les infections les plus fréquentes sont les infections urinaires (33 %), les pneumonies nosocomiales (16 %), les infections de site chirurgical (15%) et les bactériémies nosocomiales primaires (13 %) (Ministère de la Santé et des Services Sociaux [MSSS], 2005). Au Canada, 250 000 personnes sont victimes d'une infection nosocomiale (IN) chaque année et entre 8 000 et 12 000 personnes en meurent. Il a été noté que 40% des patients atteints d'un cancer et suivant un traitement de chimiothérapie vont être atteints d'une IN. Au Québec, on retrouve des tendances similaires où 90 000 à 99 000 patients sont atteints d'une IN chaque année. Ce chiffre est basé sur le taux de prévalence de 9,8 % présent dans le reste du pays. Le taux de mortalité lié aux IN se situe entre 1 % et 10 % tout dépendant du type et de la gravité de l'infection (MSSS, 2005) .

Le problème des infections nosocomiales est un phénomène en croissance, non seulement au Québec, mais aussi à travers le monde. Selon un rapport publié en 2005 par le Ministère de la Santé et des Services Sociaux (MSSS), aux États-Unis, entre 1975 et 1995, une hausse de 36 % du nombre d'infections nosocomiales dans la population a été notée (1975 : 7,2 infections pour 1000 jours d'hospitalisation vs 1995 : 9,8 infections pour 1000 jours d'hospitalisation). Mondialement, on dénombre plus de 2 000 000 infections par année aux États-Unis, 800 000 en France et 115 000 en Belgique (MSSS, 2005). Plusieurs facteurs ont influencé l'augmentation du taux d'IN au cours des dernières années: le vieillissement de la population et l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés, la promiscuité des patients dans les hôpitaux majoritairement due à l'engorgement du système de santé (augmentation du nombre d'admissions, diminution du personnel dans certaines unités), l'émergence de nouvelles souches

bactériennes ou de souches résistantes aux traitements déjà utilisés, l'utilisation abusive d'antibiotiques à large spectre ainsi que des carences dans les habitudes hygiéniques du personnel, l'entretien de surface et la stérilisation, pour ne nommer que les principaux. (MSSS, 2005)

1.1.2 Développement des infections nosocomiales et conséquences

Le développement et le degré de gravité des infections nosocomiales sont liés à la présence de plusieurs facteurs connus. Le site internet de l'Association Des Victimes d'Infections Nosocomiales (ADVIN), caractérise les infections nosocomiales à l'aide de deux facteurs principaux soit le site d'infection et le ou les germes infectieux.

1.1.2.1 Agents infectieux

L'administration à l'hôpital d'un patient le rend automatiquement susceptible au contact avec les microorganismes qui sont présents dans l'établissement. La probabilité qu'un patient contracte une maladie clinique due à ce contact dépend, entre autre, de leur résistance aux anti-infectieux, leur virulence intrinsèque et la taille de l'inoculum. (OMS, 2008)

Il peut aussi s'agir de germes présents sur un instrument ou un objet ou de contamination croisée. Les bactéries ne sont pas les seuls agents infectieux pouvant être à l'origine des infections nosocomiales, mais ce sont certainement les plus courants. Les bactéries commensales faisant partie intégrale du système humain, peuvent provoquer des infections si les défenses immunitaires du sujet sont affaiblies. On appelle infection croisée une infection due à un agent provenant d'une autre personne présente dans l'hôpital et infection endogène, une infection provenant de la propre flore du patient (OMS, 2008). Les microorganismes pouvant entraîner l'apparition de symptômes ou le développement de diverses maladies sont dits pathogènes. La sensibilité des personnes aux différents agents pathogènes peut varier principalement selon l'âge, le sexe et l'état de santé en général. L'état du système immunitaire est un facteur important lorsqu'un patient est exposé à des germes potentiellement pathogènes. La présence dans l'environnement du patient de microorganismes tels que les bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* etc.) de virus, et de champignons, augmentent donc le risque de causer des IN (OMS, 2008)

1.1.2.2 Environnement (établissements de soins)

Les établissements de soins, et en particulier les hôpitaux, représentent des environnements propices au développement des IN principalement en raison du constant va-et-vient des patients et du personnel soignant ainsi qu'au contact quotidien avec l'environnement immédiat qui peut lui aussi être porteur de microorganismes. Plusieurs types de patients (infectés, colonisés ou à risque élevé d'infection) sont présents dans l'environnement hospitalier. Il est important de faire la distinction entre ces catégories. Une personne infectée présente habituellement des symptômes d'infection : fièvre, rougeurs, enflure, pus alors que la personne colonisée est porteuse du microorganisme pathogène mais est asymptomatique. Les personnes colonisées et infectées sont des sources d'infection pour les autres patients de l'hôpital ainsi que pour le personnel et les visiteurs.

En plus des patients que l'on peut considérer comme étant une source potentielle d'infections dans les établissements de soins, d'autres facteurs peuvent jouer un rôle comme les conditions de promiscuité des patients, les transferts fréquents d'une unité de soins à une autre et la concentration de patients très réceptifs aux infections dans un même endroit (soins intensifs, unité des grands brûlés, urgence). Aussi, les carences dans l'entretien ménager et l'entretien des installations, les failles dans la stérilisation, la désinfection et dans l'application de mesures d'hygiène, la réduction du personnel dans certaines unités et leur surcharge de travail, influencent le taux d'infections nosocomiales dans les établissements. (MSSS, 2005)

1.1.3 Prévention et contrôle

L'importance des pertes liées aux infections nosocomiales, tant au niveau humain que financier, devrait motiver la création de programmes de prévention et de contrôle des infections nosocomiales de manière à mieux gérer la problématique et essayer de faire diminuer les taux d'infections. Une étude du comité sur les infections nosocomiales du Québec (CINQ) révèle que la mise en place d'un programme de prévention structuré dans les établissements de soins pourrait faire diminuer de 30 % le taux d'infections nosocomiales. L'instauration de ce type de programme coûterait environ 6,2 millions annuellement ce qui représente 8,5 % des coûts totaux engendrés par les IN. En calculant les gains associés à une diminution de 30 % des IN et en incluant les coûts engendrés par l'instauration du programme, on peut calculer qu'il y aurait des économies annuelles nettes de 44 millions de dollars. (MSSS, 2005)

L'institut national de santé publique du Québec (INSPQ) a publié un rapport en 2013 rapportant 85 recommandations à appliquer en milieu hospitalier qui pourraient aider au contrôle du taux d'infections (INSPQ, 2013). Voici les 6 plus importantes :

1) Dépistage des malades à risque à l'admission

Certains patients sont plus à risque (personnes âgées ou immunodéprimées) et devraient être examinés lors de leur admission à l'hôpital pour s'assurer qu'ils ne sont pas porteurs d'une IN. Réduire le nombre de patients colonisés ou infectés présents dans l'établissement de soins diminue automatiquement le risque de transmission bactérienne et de contamination de l'environnement. (Henderson, 2006)

2) Isolement des patients reconnus à risque potentiel dans une chambre privée

Les patients à risque devraient être installés dans des chambres privées jusqu'à l'obtention des résultats confirmant qu'ils ne sont pas colonisés par une IN. C'est une façon simple, mais assez coûteuse, de prévenir la transmission de patient-à-patient dans l'hôpital

3) Hygiène des mains avant et après tout contact avec un patient, qu'il soit à risque ou non

L'hygiène des mains par le personnel hospitalier est un aspect très important de la transmission des infections nosocomiales. La plupart des transmissions de SARM patient-à-patient proviennent des mains des travailleurs de la santé. La cause principale des infections nosocomiales et de la propagation d'organismes comme le SARM est le manque d'hygiène des mains. La décontamination devrait se faire avant le contact avec les patients, mais aussi après. En effet, les travailleurs devraient se laver les mains après avoir touché à la peau (intacte ou non) des patients, aux fluides biologiques, aux excréments et aux muqueuses de manière à éviter la transmission par contact direct ou indirect. Aussi, il est important de se décontaminer les mains après un contact avec l'équipement médical ainsi que les objets entourant les patients (Henderson, 2006).

4) Mesures «barrières»

Port de blouses, de gants, masques etc. avant tout contact avec un patient à risque. Il est important de signaler toutefois que le port de gants n'exclut jamais le lavage des mains.

5) Hygiène de tout l'environnement

Une chambre d'hôpital doit être nettoyée et éventuellement désinfectée une fois par jour et chaque fois que nécessaire dans la journée en cas de souillure, et cela par un personnel ayant reçu une formation spécifique. Une chambre où a séjourné un patient contaminé doit être rigoureusement désinfectée avant d'être occupée par un autre patient, ce qui peut demander plusieurs heures. Il est évident qu'un taux d'occupation des lits trop élevé, avec de nombreux patients en attente d'une hospitalisation, est un obstacle à l'application rigoureuse de cette mesure et favorise le développement des infections dans l'établissement (INSPQ, 2013).

6) Contrôle de l'utilisation des antibiotiques

Cela a pour but de prévenir le développement de la résistance des bactéries aux traitements antibiotiques. D'après les études les plus récentes aux États-Unis et en Europe, au moins 30 % des prescriptions d'antibiotiques sont inutiles ou inadéquates (choix de l'antibiotique et/ou dose inadaptée). Cette mesure demande une accessibilité à l'information et une sensibilisation non seulement de la part des médecins, mais aussi des patients et donc du grand public qui, trop souvent, va demander des antibiotiques par manque d'information. Il existe maintenant des tests permettant aux médecins de déterminer rapidement si l'infection est d'origine bactérienne ou virale (dosage de la procalcitonine). Dans le cas d'une infection virale, les antibiotiques sont inutiles et grâce à ce test, il est alors possible de ne pas prescrire d'antibiotiques inutilement (ADVIN, 2011).

Résistance aux antibiotiques

La grande utilisation d'antibiotiques, particulièrement ceux à larges spectres, peut créer des conditions qui vont sélectionner les bactéries ayant des mécanismes de résistance contre ces antibiotiques. Plusieurs études ont rapporté une association positive entre l'utilisation d'agents antimicrobiens et l'incidence de colonisation ou d'infection du SARM dans les établissements de soins (Henderson, 2006). Théoriquement, plus un antibiotique est utilisé, plus un grand nombre de bactéries est tué. Par contre, les bactéries résistantes peuvent survivre et ainsi se développer et se répandre dans les établissements de soins. C'est ici que les mesures d'hygiène jouent un rôle important, car si elles sont négligées, la pression sélective de ces dernières est temporairement levée et il peut y avoir une multiplication plus rapide de la flore bactérienne, surtout pour les bactéries qui sont résistantes aux antibiotiques (Martineau, 2009). Ces dernières, particulièrement le SARM, l'*Enterococcus* résistant à la vancomycine (ERV) et l'*E. coli*, peuvent alors se

transmettre à des personnes qui ne sont pas sous traitement. Selon un rapport de l'OMS, 60 % des infections nosocomiales sont causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques (Rosner, Becker, Wong, Miller, & Conly, 2004).

1.1.4 Bactéries nosocomiales et les infections associées

1.1.4.1 *Staphylococcus aureus* (SARM)

Staphylococcus aureus est une bactérie à gram-positif qui colonise la peau d'environ 30 % de la population mondiale. La transmission de la bactérie se fait habituellement par contact direct avec les porteurs ou par contact indirect avec les écoulements des lésions ou les sécrétions provenant des personnes atteintes par le microorganisme. Il peut aussi avoir une transmission mère-enfant lors de l'accouchement (ASPC, 2011). Le SARM a une période d'incubation variable, ce qui fait que son taux d'infection est élevé, mais il est habituellement entre 4 et 10 jours. Par contre, plusieurs mois peuvent s'écouler entre la colonisation et l'apparition de la maladie ce qui fait que les personnes colonisées ne sont pas toujours au courant et ne peuvent pas nécessairement prendre de précautions pour diminuer les risques de contamination de leur environnement (ASPC, 2011). Au Québec, la proportion de SARM parmi les bactériémies nosocomiales est passé de 35, 9% en 2006-2007 à 23,6 % en 2011-2012 (MSSS, 2013). En général, 30 à 60 % des patients hospitalisés qui sont colonisés par le SARM présenteront une infection à cette bactérie (INSPQ, 2006). Des études sur la prévalence du SARM au Canada indique qu'environ 4,2 % des patients hospitalisés seront infectés ou colonisés par la bactérie, entraînant des frais hospitaliers annuels d'environ 36,3 millions de dollars (ASPC, 2015).

Staphylococcus aureus est considéré comme un pathogène opportuniste de la flore normale. Il se présente sous une forme clinique différente chez la population générale, les nouveau-nés et les personnes hospitalisées, le rendant plus difficile à diagnostiquer. L'infection peut se manifester sous forme d'intoxication alimentaire, d'infection localisée, d'infection générale superficielle telle l'impétigo ou la folliculite, ou d'infection profonde comme la méningite, l'arthrite septique et la pneumonie (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013).

Les souches de *S. aureus* sont classées dans deux catégories selon leur susceptibilité aux antibiotiques de la famille des bêta-lactams soit les SASM (*Staphylococcus aureus* sensible à la

méthicilline) et les SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline). Le SARM est la plus importante cause d'infection nosocomiale résistante aux antibiotiques. En effet, le SARM est le pathogène résistant aux antibiotiques le plus souvent identifié dans les hôpitaux en Europe, en Amérique, en Afrique du Nord, au Moyen-Orient ainsi qu'en Asie de l'Est. Un plus haut taux de mortalité est associé avec les infections au SARM qu'avec celles au SASM. Cela est causé majoritairement par le fait que le traitement pour le SARM est plus complexe en raison du choix thérapeutique limité et qu'il est souvent plus toxique et moins efficace (INSPQ, 2006).

En 2013, 30 pays ont pris part au recensement fait par le «European Centre for Disease Prevention and Control» et 40 893 cas de *S. aureus* invasif ont été rapportés. De manière générale, 18 % de ces cas étaient des cas de SARM alors que chez 7 des 30 pays, plus de 25% des cas de *S. aureus* étaient dus au SARM. Le déclin des cas de SARM est moins prononcé dans les dernières années que ce qui a été observé au début des années 2000, mais la tendance semble diminuer chez 9 des 30 pays qui ont pris part au recensement (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013).

La baisse de sensibilité aux médicaments de certaines souches de *S. aureus* est définitivement rendue une problématique importante à travers le monde, car elle prend de plus en plus d'ampleur. Les souches qui sont résistantes à la méthicilline (SARM) sont la cause d'épidémies importantes à travers le monde entier. En plus de la résistance à la méthicilline, une résistance grandissante à la vancomycine a été identifiée ce qui rend les risques de multirésistance encore plus importants (ASPC, 2011).

La colonisation par le SARM est un phénomène commun autant chez les individus en bonne santé que chez les patients hospitalisés. La colonisation peut se faire sur le visage, les mains, l'aîne, les aisselles, mais se fait majoritairement sur l'épithélium des narines. Les patients sont habituellement asymptomatiques ce qui fait que le phénomène de colonisation augmente les risques d'infection. Dans la communauté, 36 % de la population est colonisée par un *S. aureus* et 9 % d'entre eux sont colonisés par le SARM. Chez les travailleurs de la santé, 6 % sont colonisés par un SARM (Henderson, 2006)

1.1.4.2 *Clostridium difficile*

Clostridium difficile est une bactérie sporulée qui produit une toxine causant de la diarrhée et d'autres infections intestinales sérieuses. Elle est considérée comme une bactérie opportuniste et elle est la principale cause de diarrhée observée chez les patients hospitalisés dans les établissements de soins de courte et de longue durée dans les pays industrialisés. Les personnes en bonne santé ne sont habituellement pas vulnérables à *C. difficile*, mais les personnes âgées et les personnes qui souffrent de maladies ou de conditions nécessitant des antibiotiques et certains autres médicaments pour l'estomac sont plus susceptibles d'acquérir cette infection (MSSS, 2012). Parce que *C. difficile* est présent dans les matières fécales, il est probable que les surfaces et les objets dans les chambres des patients, ainsi que leurs objets personnels, se contaminent. Une personne peut s'infecter si elle touche des surfaces ou des objets contaminés par des matières fécales et qu'elle porte par la suite ses mains à la bouche ou au nez (ADVIN, 2011).

Au Canada, en 2013, le taux global d'infections liés à *C.difficile* associées aux soins de santé était de 3,99 cas pour 1000 hospitalisations, ce qui est inférieur au taux déclaré de 2007 qui était de 4,61 cas par 1000 hospitalisations. En 2013 aussi, 3,1 % des décès dans les hôpitaux du Programme canadien de surveillance des infections nosocomiales (PCSIN) étaient attribuables à l'infection à *C.difficile* comparativement à 4,8 % en 2007. On estime que 1,5 % de tous les patients hospitalisés contracteront une infection à *C. difficile* pendant leur hospitalisation. Environ 15 % d'entre eux développeront une maladie grave et 6 % décéderont des suites de l'infection. (ASPC, 2015). La bactérie est répandue dans le monde entier et les statistiques démontrent que de 2 à 3 % de la population mondiale est porteur de la bactérie (ASPC, 2011).

La prise d'antibiotiques augmente le risque d'acquérir une diarrhée causée par *C. difficile*. Le traitement par antibiotiques modifie les taux normaux de bactéries commensales présentes dans l'intestin et le côlon. Lorsque ce type de bactéries y est moins nombreux, *C. difficile* en profite pour se développer et produire des toxines qui entraînent une infection. (ADVIN, 2011) *C.difficile* est habituellement sensible au métronidazole et à la vancomycine, mais des souches résistantes à ces deux médicaments ont été trouvées dans la population. Comme avec toutes les bactéries résistantes aux antibiotiques, des traitements alternatifs doivent être trouvés (ASPC,

2011).

La formation de spores par la bactérie la rend passablement résistante aux désinfectants, mais les spores peuvent être éliminées si elles sont en contact pour une période prolongée avec des désinfectants puissants comme le glutaraldéhyde > 2 %. De manière générale, les spores peuvent survivre de manière prolongée à l'extérieur de l'hôte dû à leur résistance importante aux facteurs environnementaux comme la chaleur. En effet, les spores sont inactivées seulement si elles sont en contact avec de la chaleur humide, soit à 121 °C pendant 15 minutes (ASPC, 2011).

1.1.4.3 *Enterococcus* résistant à la vancomycine (ERV)

Les entérocoques sont des bactéries commensales à gram-positif, anaérobie facultative, retrouvées habituellement dans l'intestin et les selles pouvant causer des infections urinaires, des infections de plaies et, plus rarement, des infections du sang.

Les ERV, ou *Enterococcus* résistants à la vancomycine, sont des entérocoques qui ont développé une résistance à plusieurs antibiotiques dont la vancomycine, ce qui limite le choix d'antibiotiques pour le traitement. Les ERV se transmettent d'un patient colonisé à un autre patient par les mains contaminées du personnel soignant (en touchant au patient directement ou en étant en contact avec son environnement immédiat). Le moyen le plus efficace et le plus simple d'éviter la transmission de la bactérie est que la personne porteuse et les membres de sa famille se lavent les mains régulièrement. Il faut aussi nettoyer l'environnement immédiat (chambre et salle de bain) en utilisant un désinfectant (MSSS, 2012). L'ERV peut survivre pendant des semaines sur des surfaces, jusqu'à 77 jours dans le sol et jusqu'à 90 jours sur les linges souillés. L'étape de décontamination est donc très importante de manière à éviter la dissémination de la bactérie dans les hôpitaux (ASPC, 2011). En 2013, le PCSIN signalait 324 cas d'infection par ERV soit un taux de 0,53 pour 10 000 jours-patients. 97 % des cas étaient associés aux soins de santé et 54 % de toutes les infections touchaient les patients de 65 ans et plus (ASPC, 2015).

1.1.4.4 *Listeria monocytogenes*

La bactérie *Listeria monocytogenes* est un bacille à gram-positif, aérobie et non sporulé pouvant croître à 4 °C. Elle est un agent pathogène causant des infections alimentaires appelées listérioses, contractées lorsqu'un patient mange un aliment ayant été en contact avec la bactérie.

Chaque année aux États-Unis, on estime à 1600 le nombre de nouveau cas de listériose. De ces 1600 personnes, 260 vont en mourir (ASPC, 2011).

Listeria monocytogenes survit facilement dans le sol, l'eau, les aliments ainsi que dans les matières fécales. Les animaux peuvent être porteurs de la bactérie tout en étant asymptomatiques et peuvent donc contaminer les produits laitiers ainsi que les viandes que nous consommons. Le pathogène se manifeste par une méningo-encéphalite ou une septicémie et ce, majoritairement chez les aînés, les nouveau-nés ainsi que les sujets immunodéprimés. Les symptômes peuvent varier d'une personne à l'autre dépendamment du type d'hôte infecté, mais les personnes affectées par la listériose sont habituellement atteintes de fièvre et de maux musculaires ainsi que de maux de tête, de convulsion et de perte d'équilibre. La transmission peut se faire par contact direct avec du matériel infecté, par ingestion d'aliments contaminés ou même par inhalation de l'organisme (ASPC, 2011).

Le Food and Drug Administration (FDA) recommande de simples mesures pour diminuer les risques de contraction de la bactérie dans la nourriture telles que de bien laver et rincer les produits consommés crus comme les fruits et les légumes, laver les instruments qui ont été en contact avec ces produits, s'assurer d'une bonne température dans les réfrigérateurs et les congélateurs pour s'assurer que la bactérie ne pourra pas croître et bien faire cuire les viandes avant la consommation.

Lorsque la bactérie *Listeria* contamine la machinerie de l'industrie agro-alimentaire, elle peut y vivre pendant des années. Elle peut être trouvée dans une variété de produits crus (viande non-cuite, légumes), mais aussi dans des aliments tels que les fromages, les hot dog et les viandes froides et fumées (ASPC, 2011).

1.2 Persistance des bactéries et prévention de la transmission

Les pathogènes qui causent des infections nosocomiales doivent avoir deux propriétés spécifiques. Ils doivent tout d'abord être reconnus comme des pathogènes hospitaliers et ils doivent avoir l'habileté de survivre sur les surfaces présentes dans l'environnement hospitalier pour de longues périodes de temps (Dancer, 2009). En général, les bactéries vont se retrouver sur les sites les plus fréquemment touchés par les mains des patients et du personnel hospitalier. (Rampling, 2001). *Staphylococcus aureus* peut survivre facilement à l'extérieur de son hôte

(Hota, 2004). Il a été noté que l'organisme peut vivre pendant neuf semaines dans des conditions hospitalières et ce, malgré le séchage naturel et pendant plus d'une année dans la poussière (Rampling, 2001). Dans des conditions expérimentales, le SARM était viable pour 2 jours sur une surface de plastique laminé et pendant environ 7 jours sur des planchers et des pièces de monnaie. Finalement, on note que la bactérie peut vivre pendant 46 heures sur les surfaces de verre (ASPC, 2011).

Les surfaces sur lesquelles se retrouvent les bactéries jouent un rôle sur leur viabilité, car elles ont différentes propriétés qui peuvent soit aider ou nuire à la viabilité bactérienne. De plus, les différentes espèces de bactéries ne réagissent pas de la même façon sur ces surfaces.

Il est difficile d'évaluer la propreté d'une surface en se fiant uniquement sur un critère visuel compte tenu du fait que les organismes contaminant ces surfaces sont microscopiques (Dancer, 2009). Des audits visuels peuvent être faits, mais les résultats sont souvent biaisés. Il n'existe pas pour l'instant de standards utilisés pour déterminer la propreté des surfaces dans les hôpitaux (Dancer, 2009). Une étude récente a comparé l'évaluation visuelle avec un test biochimique (ATP) et un test microbiologique. Les résultats ont pu démontrer que lorsque les surfaces apparaissaient propres, plus de trois quarts de ces dernières démontraient une présence d'ATP et moins de la moitié démontraient une absence de microorganismes. Ces résultats démontrent que l'évaluation visuelle ne peut être utilisée comme seul moyen d'évaluation de la propreté d'une surface. De nouveaux standards de propreté hospitalière doivent être développés de façon à mieux contrôler les infections nosocomiales. Il pourrait être intéressant de s'inspirer des standards utilisés dans l'industrie alimentaire (Dancer, 2009).

Les surfaces situées à proximité des patients et qui sont touchées sur une base régulière représentent le plus grand risque de contamination. Il a été reconnu que si un membre du personnel hospitalier entre dans une chambre occupée par un patient atteint du SARM, 2/3 du personnel va être contaminé par la bactérie sur leurs gants ou sur leur uniforme. Même s'il n'y a pas de contact avec le patient, 4 employés sur 10 vont ressortir de la chambre en transportant la souche de SARM du patient en question (Kutter & Sulakvelidze, 2005)

Il est possible et intéressant de faire le parallèle entre la survie des bactéries sur les surfaces et celle des virus. Les virus sont moins résistants sur les surfaces que les bactéries, mais il est important d'étudier les facteurs qui influencent leur survie, car ces mêmes facteurs peuvent

influencer la survie bactérienne aussi. Les virus peuvent survivre pour de longues périodes de temps sur des surfaces telles que les dispositifs médicaux, les fomites et la peau humaine. Les surfaces peuvent être contaminées directement par contact avec les sécrétions corporelles et les fluides ou indirectement par des gouttelettes contaminées ou autres fomites contaminés (Vasickova, Pavlik, Verani & Carducci, 2010). Différents facteurs peuvent affecter la survie des virus sur les surfaces. Les facteurs physiques tels que humidité relative (HR), la température, la lumière du soleil et les rayons UV jouent un rôle dans la survie de ces derniers (Kutter & Sulakvelidze, 2005). Les facteurs chimiques comme le pH, le sel et la force ionique, l'état d'adsorption et les matières organiques ainsi que les agents chimiques antiviraux influencent aussi la survie virale. Des études ont démontré que la survie des virus augmente avec une plus grande adsorption aux surfaces et que les particules virales immobilisées (adsorbées) gardent leur potentiel infectieux après les désadsorptions (Vasickova et al., 2010). Des facteurs biologiques comme la présence d'autres microorganismes, le type de virus et la présence de l'enveloppe peuvent diminuer ou augmenter la période de survie sur les surfaces. La majorité des virus restent viables plus longtemps sur les surfaces non poreuses que poreuses, mais il y a certaines exceptions et la présence d'autres microorganismes peut influencer la survie des virus en surface. Certaines bactéries sont capables de produire des substances avec un poids moléculaire faible qui peuvent désactiver les virus. Par contre, augmenter la présence bactérienne sur une surface peut protéger les virus contre la dessiccation et la désinfection.

Tous ces facteurs qui influencent la survie des virus peuvent aussi avoir un effet sur les bactéries. Il est donc important de prendre en compte les conditions dans lesquelles les surfaces infectées se trouvent de manière à analyser les probabilités de contamination (Vasickova et al., 2010). Diminuer la transmission d'infections nosocomiales par l'environnement est faisable en appliquant un régime de nettoyage, de désinfection et de stérilisation efficace et qui sera suivi à la lettre par le personnel des établissements de soin. Il est bon de noter que 90 % des microorganismes se trouvent dans la poussière visible et un simple nettoyage de routine peut éliminer cette poussière. Il a été démontré que plusieurs types de bactéries peuvent survivre pendant des jours, voire des mois sur les surfaces solide (voir tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Persistance des bactéries sur les surfaces

Type de bactérie	Durée
<i>S.aureus (SARM)</i>	7 jours à >7 mois
<i>Acinetobacter</i>	3 jours à >5 mois
<i>C.difficile</i>	>5 mois
<i>ERV</i>	5 jours à >4 mois
<i>E.coli</i>	2h à 16 mois
<i>Klebsiella</i>	2h à >30 mois
Norovirus	8h à 7 jours

(adapté de Dancer, 2014)

1.3 Techniques de décontamination de surfaces : limites et avancements

1.3.1 Désinfectants chimiques

Les désinfectants chimiques sont couramment utilisés pour désinfecter des surfaces dures et non poreuses en industries et en institutions. Pour être considéré comme un produit de stérilisation, il faut que le composé (ou la technique) réduise la charge microbienne sur la surface de l'ordre de 10^{-5} (Sattar, 2010). Il existe un très vaste échantillonnage de produits de désinfection commerciaux, mais au cours des dernières années, peu de nouveaux composés ont été mis sur le marché. Cela peut être expliqué par le fait que Santé Canada a des exigences très spécifiques pour l'obtention d'un D.I.N. (Drug Identification Number). Des améliorations aux produits déjà existants ont été faites. Par exemple, des agents surfactants ont été ajoutés au peroxyde d'hydrogène pour augmenter sa vitesse d'action, étendre son spectre d'activité microbienne et augmenter sa compatibilité avec les différentes surfaces. Une nouvelle technologie s'est aussi développée : l'utilisation d'eau suroxygénée (Sattar, 2010).

Les différentes méthodes de nettoyage et de désinfection doivent être adaptées au niveau de contamination présent dans l'environnement ainsi qu'au niveau d'asepsie requis. Plusieurs critères doivent être respectés pour l'utilisation de désinfectants dans les établissements. En général, les produits doivent être faciles à utiliser, non volatils, sécuritaires pour le matériel ainsi

que les personnel soignant et les patients, dépourvus d'odeurs désagréables et finalement, ils doivent avoir un effet désinfectant en 10 minutes ou moins (OMS, 2008).

Les désinfectants font partie intégrale de la prévention et l'éradication des infections nosocomiales. Actuellement, la lutte contre la propagation des infections nosocomiales en environnement hospitalier se fait principalement à l'aide d'agents chimiques. Ils sont répertoriés en cinq classes principales : phénolés, ammonium quaternaire, peroxyde d'hydrogène, produits chlorés et acides organiques (MSSS, 2009). Chaque produit possède des caractéristiques désinfectantes et/ou nettoyantes qui lui sont propres. Le recours à ces produits chimiques peut causer plusieurs inconvénients importants, comme une toxicité chimique, le développement d'une résistance bactérienne et la détérioration des surfaces traitées (Dettenkofer et al., 2004). Dans certains cas, la détérioration se traduit par une augmentation de la porosité rendant la décontamination de plus en plus difficile. Ces produits posent un danger potentiel autant pour le personnel qui les utilisent que pour les patients et l'environnement et requièrent des précautions de sécurité particulières (Dettenkofer et al., 2004; Martineau, 2009).

Les désinfectants de la famille des composés d'ammoniums quaternaires (CAQ) sont beaucoup utilisés pour la désinfection de surfaces. Les ammoniums quaternaires sont des agents chimiques qui sont utilisés en tant que désinfectants, surfactants, assouplisseurs ou même comme agent antistatique (American Meat Institute, 2011). Un des avantages majeurs des ammoniums quaternaires est qu'ils ne s'attaquent pas aux surfaces comme les agents oxydants. Aussi, selon leur concentration, on peut obtenir un effet de rémanence (bactériostatique) avec une faible concentration et un effet bactéricide avec une forte concentration. Ils sont donc très versatiles. Par contre, lorsqu'ils sont mélangés avec de la matière organique, ils perdent de leur efficacité. Il faut donc s'assurer que les surfaces sur lesquelles ils sont appliqués ne contiennent pas de matières organiques. (MSSS, 2009).

1.3.2 Décontamination par peroxyde d'hydrogène

Un procédé utilisant un système de brume sèche à base de peroxyde d'hydrogène (système Sterinis) a récemment été étudié pour être utilisé pour la décontamination bactérienne, particulièrement pour le SARM et *A. baumannii*. Un des avantages de ce système est la possibilité de désinfecter des endroits qui sont habituellement plus difficiles d'accès avec les méthodes utilisées présentement. Dans une étude faite par Piskin, Celebi, Mengeloglu et

Yumusak (2011), des suspensions de McFarland 0.5 de deux espèces bactériennes ont été inoculées sur des surfaces d'acier inoxydable stérile. Les surfaces ont été placées dans des boîtes de Pétri et disposées à différents endroits dans des unités de soins intensifs, comme sur le plancher, dans un tiroir, sur la table de chevet et sur les appareils (couvercle ouvert ou fermé). Lorsqu'il y avait une barrière physique (couvercle fermé ou obstruction du Pétri par un tiroir par exemple), le système n'était pas efficace. Par contre, dans un contexte de surfaces à aires ouvertes, le système Sterinis a pu tuer le SARM et *A. baumannii* en seulement 1 cycle d'utilisation.

Falagas et al. (2011) ont fait une analyse de 10 études sur l'utilisation du système de décontamination avec le peroxyde d'hydrogène, soit sous forme de vapeur ou de brume sèche, pour essayer de mesurer l'efficacité du système. Dans toutes les études, le nombre de bactéries récupérées après l'utilisation du système de peroxyde d'hydrogène était plus bas que le nombre de bactéries récupérées après l'utilisation des méthodes conventionnelles. Un des avantages de l'utilisation du peroxyde d'hydrogène est qu'il est considéré comme un désinfectant à large spectre et est donc efficace contre la majorité des espèces bactériennes impliquées dans les infections nosocomiales. Le peroxyde d'hydrogène semble avoir une faible toxicité et a une bonne compatibilité avec la majorité des surfaces sur lesquelles il est employé. De plus, il se dégrade en oxygène et en eau, le rendant moins nocif pour la santé que ses homologues chimiques.

Par contre, les systèmes de décontamination par peroxyde d'hydrogène sont dispendieux, ne peuvent être utilisés dans des pièces déjà occupées et requièrent un opérateur expérimenté et qualifié. Aussi, son efficacité sur certains matériaux comme le lin ou le coton est diminuée. Ces limites doivent être prises en compte lorsque ce système de décontamination est choisi (Dancer, 2014).

1.3.3 Inhibition de l'adhésion bactérienne par application de nanoparticules ou biosurfactants

L'adhésion bactérienne est la première étape dans la colonisation, l'invasion et la formation de biofilm. On appelle biofilm un agrégat dense de bactéries adhérant entre elles et à une surface, marqué par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice (Azizian, Nasab, & Ahmadi 2013). Les biofilms peuvent se retrouver dans les équipements médicaux (cathéter, implants, prothèses

etc) ainsi que dans les équipements du domaine environnemental et agroalimentaire (Azizian et al., 2013). La résistance aux antibiotiques des biofilms est jusqu'à 1000 fois plus importante que lorsque les bactéries sont sous forme libre, en raison de leur croissance lente et de la présence d'exopolysaccharides imperméables (Azizian et al., 2013). La présence de biofilm dans le milieu hospitalier est problématique, car elle favorise la survie des bactéries dans l'environnement. On sait que 90 % des bactéries dans l'environnement sont attachées à une surface et plusieurs d'entre elles forment des colonies sessiles. L'adhésine est la protéine responsable de l'attachement des bactéries aux surfaces et elle a deux fonctions importantes : elle permet aux bactéries de s'attacher à certaines structures précises sur les surfaces et elle permet aux bactéries de résister aux forces hydrodynamiques (système de « lock and key »). Si, pour une raison quelconque, il y a mutation et perte de l'adhésine, la bactérie devient non-virulente, voire même probiotique dans certains cas. Habituellement, c'est l'action de plusieurs adhésines qui est important pour la virulence. La prévention de l'adhésion bactérienne est une bonne stratégie pour interférer avec la colonisation des bactéries (Klemm, Munk Vejborg, & Hancock, 2010).

On peut inhiber l'adhésion bactérienne sur les surfaces inertes par revêtement des surfaces avec des macromolécules. Une étude de Bernbo et al. (2006), démontre que le recouvrement de surface d'acier inoxydable avec un extrait de muscle de poisson fait dramatiquement diminuer l'adhésion bactérienne. On peut aussi prévenir la synthèse d'adhésine ou inhiber les récepteurs de l'adhésine (groupes fonctionnels de glycoprotéines ou de glycolipides) et même faire des interférences métalliques. Les cations métalliques sont essentiels à la croissance bactérienne, à l'attachement et à la formation de biofilms.

Plusieurs ammoniums quaternaires sont d'excellents agents antibactériens en raison de leur activité biocide efficace, leur durabilité à long terme et leur compatibilité avec l'environnement. Dans cet article de Song, Kong, & Jang (2011), l'ammonium quaternaire silane a été appliqué pour modifier une surface faite de nanoparticules de silice. L'ammonium quaternaire a donné à la surface de silice des propriétés antibactériennes et hydrophobiques. De plus, la surface de verre qui avait été recouverte avec les particules de silice a présenté une activité d'inhibition de la croissance bactérienne. Une des causes majeures d'échec d'implantation d'appareils médicaux et d'implants est l'adhésion et la croissance de microorganismes sur les prothèses lors de l'insertion de l'appareil. Il a déjà été démontré que les bactéries ont plus de difficulté à adhérer aux surfaces hydrophobiques en raison de la faible énergie de liaison à l'interface entre la surface

hydrophobique et les bactéries. Par contre, le traitement hydrophobique n'est pas assez pour protéger complètement une surface contre l'adhésion bactérienne; les quelques bactéries qui réussissent à adhérer vont pouvoir pousser et former le biofilm. Les biofilms peuvent agir comme réservoirs de pathogènes dans les hôpitaux et peuvent offrir un environnement favorable pour inciter la persistance des pathogènes pour de longues périodes de temps. Il est donc important de développer des techniques pour les éradiquer.

Dans une étude de Zeraik & Nitschke (2010), l'attachement de *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *M. luteus* a été mesuré sur des surfaces de polystyrène traitées avec les biosurfactants surfactine et rhamnolipide. L'effet de la température (35, 25 et 4 °C) sur l'effet anti-adhésif des produits a aussi été étudié. Les résultats ont démontré que la surfactine réussit à inhiber l'adhésion bactérienne dans toutes les conditions analysées; il y a eu réduction de 63-66 % de l'adhésion à 4 °C chez toutes les espèces bactériennes. L'activité anti-adhésive de la surfactine a augmenté avec la baisse de température, démontrant que la température est un paramètre important dans l'étude de l'adhésion aux surfaces. Les biosurfactants ont plusieurs avantages sur les surfactants synthétiques. Ils ont une faible toxicité, ils sont biodégradables, ils présentent une diversité chimique, ils sont efficaces même sous des conditions environnementales extrêmes (température, pH, force ionique), ils offrent une activité de surface très forte, ils ont un pouvoir émulsifiant et ont des propriétés antimicrobiennes et antiadhésives. Une des hypothèses pour expliquer la baisse d'adhésion est que le biosurfactant diminue les interactions hydrophobiques entre la surface et la bactérie diminuant ainsi l'adhésion microbienne. (Zeraik & Nitschke, 2010).

1.3.4 Surfaces antimicrobiennes

Contrairement au principe de désinfection qui est à refaire sur une base régulière, les surfaces antimicrobiennes pourraient être une alternative pour limiter la contamination par l'environnement. Une étude par Varghese et al. (2013) a permis de démontrer que des surfaces de verre et de céramique recouvertes de nanoparticules d'argent et de silice pouvaient inhiber la prolifération de plusieurs espèces bactériennes. Dans un contexte hospitalier, une diminution de plus de 5 log de SARM a été obtenue après un contact entre la bactérie et la surface antimicrobienne de 24 heures. Cette étude démontre que les revêtements de surface ont une bonne activité antibactérienne et pourraient être étudiées de manière à trouver les meilleures combinaisons de matériaux pour obtenir la meilleure efficacité (Varghese et al., 2013).

Salgado et al (2013) a réalisé une étude comparative où la transmission de SARM et de ERV dans les unités de soins intensifs était mesurée dans des salles avec ou sans recouvrement des surfaces avec un alliage de cuivre. Les 6 surfaces les plus touchées de chaque pièce étaient recouvertes ou non de cuivre. 12,81 % des patients admis dans les pièces sans alliage de cuivre ont développé ou ont été colonisés par le SARM ou le ERV vs 7.14 % des patients dans les pièces avec alliage de cuivre. Cette diminution significative de 5.67 % démontre que l'effet antimicrobien du cuivre a un impact marqué sur la transmission des pathogènes environnementaux (Salgado et al., 2013).

1.3.5 Traitement à la vapeur

Les surfaces dans les établissements de soins de santé sont souvent contaminées par des organismes et des biofilms. Il est reconnu que les biofilms sont responsables de 65 % des IN (L. Song, Wu, & Xi, 2012). Une technologie à base de vapeur pourrait être utilisée pour la désinfection des biofilms dans ce type d'environnement. Des biofilms formés par *E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* ont été utilisés pour mesurer l'efficacité de la technique (L. Song, Wu, & Xi, 2012). Un traitement à la vapeur de 3 secondes permet de tuer rapidement les 4 types de biofilms testés.

Les techniques habituelles d'élimination des biofilms sont l'utilisation d'hypochlorite de sodium, les ammoniums quaternaires, les désinfectants phénoliques, le peroxyde d'hydrogène et les ions d'argents. Ces composés sont souvent toxiques pour les humains et inefficaces pour éradiquer les biofilms. Une diminution de plus de 4 log a été obtenue après un traitement à la vapeur de 5 secondes sur des coupons de polycarbonate pour les 4 espèces bactériennes. En comparaison, l'utilisation d'hypochlorite de sodium sur la surface de polycarbonate pendant 10 minutes à une concentration de 10 ppm contribue à une diminution de 1,8 log lorsqu'utilisé contre *E. coli* (Song, Wu, & Xi, 2012).

L'utilisation d'un traitement à la vapeur dans les hôpitaux pourrait causer certains risques. En effet, la vapeur qui est utilisée sur les surfaces finit par revenir à l'état liquide et laisse des résidus d'eau. Cela pourrait causer un risque de chutes sur les planchers pour les patients, le personnel hospitalier et les visiteurs. Aussi, lorsque le nettoyage d'une unité bondée de patients est à faire, l'accès aux sites à désinfecter risque d'être plus difficile. Finalement, l'inhalation de la vapeur pourrait aggraver les problèmes respiratoires des patients ayant déjà des conditions

respiratoires (Dancer, 2014).

1.3.6 Phages

L'utilisation de bactériophages pour créer des surfaces bioactives semble avoir pris de plus en plus d'ampleur dans les dernières années. Les surfaces bioactives sont définies comme un substrat fonctionnalisé avec des éléments spécifiques de reconnaissance, utilisé pour détecter, capturer et/ou désactiver un microorganisme choisi (Hosseinidoust, Olsson, & Tufenkji, 2014). Ces substrats peuvent être utilisés comme biosenseurs ou comme antimicrobiens sur les revêtements de surfaces ou sur les dispositifs médicaux (stent, cathéters, implants). Les phages ont l'avantage, comparé à d'autres agents biologiques (anticorps), de pouvoir mieux se conserver sur les surfaces, d'être moins dispendieux et de pouvoir être produits plus facilement. Les phages lytiques ont une fonctionnalité double, car ils peuvent capturer ainsi que détruire leur hôte. Les phages sont plus spécifiques que les agents chimiques, les antibiotiques et les particules d'argent, ce qui est bénéfique pour leur utilisation contre les pathogènes d'origine alimentaire. Par contre, l'utilisation des bactériophages pour créer des surfaces bioactives comporte certains défis. Premièrement, si on veut utiliser les phages sur des surfaces, on doit s'assurer qu'ils gardent leur capacité d'infection. Aussi, si on veut les utiliser comme biosenseurs, une haute densité de surface doit être obtenue pour augmenter la sensibilité. 95 % des phages sont asymétriques en raison de leurs fibres caudales et il est donc impératif que les phages soient dans la bonne orientation pour pouvoir capturer la protéine qu'ils reconnaissent sur les bactéries cibles (Hosseinidoust, Olsson, & Tufenkji, 2014).

1.4 Bactériophages

1.4.1 Définition

Les bactériophages sont présents partout sur la planète et sont reconnus comme étant l'entité vivante la plus abondante sur Terre (voir figure 1.1). Ils seraient dix fois plus nombreux que les bactéries (Jończyk, Kłak, Międzybrodzki, & Górski, 2011). En effet, on estime entre 10^{30} et 10^{32} bactériophages dans notre environnement. Ils se retrouvent dans les océans, dans le sol, dans l'eau potable et même dans la nourriture que nous consommons. Ils sont définis comme des virus qui infectent les bactéries et tout comme les virus, ils sont reconnus comme étant des parasites absolus. En effet, ils ne possèdent pas la machinerie nécessaire à leur réplication et ont donc besoin d'emprunter celle de leur hôte de manière à pouvoir proliférer librement. Chaque phage contient son génome qui est enveloppé dans une couche de protéines ou de lipoprotéines appelée capsid (Kutter & Sulakvelidze, 2005).

1.4.2 Classification et structure

Plus de 5000 bactériophages ont été analysés et ces derniers sont classés selon l'ICTV (« International Committee on Taxonomy of Viruses »). Le matériel génétique est habituellement utilisé pour faire la classification générale des bactériophages. Le génome d'ADN ou d'ARN peut être à brin simple ou double et circulaire ou linéaire (Sharp, 2001). On reconnaît un ordre, 13 familles et 31 genres chez les bactériophages. Environ 40 critères sont utilisés pour la classification, mais aucun critère universel n'existe pour le genre et l'espèce. (Kutter & Sulakvelidze, 2005). De manière générale, plus de 90 % des phages ont un génome composé d'ADN double brin localisé dans une capsid ayant une géométrie icosaédrique et possédant une queue de format variable (Monk, Rees, Barrow, Hagens, & Harper 2010). Ils font partie de l'ordre des *Caudovirales*. Trois familles découlent des *Caudovirales* et sont définies par le type de fibre caudale (fibres formant la queue) présente sur le phage. Soixante pourcent des phages sont des *Siphoviridae* et possèdent une longue queue flexible, 25 % sont des *Myoviridae* avec une queue contractile et 15 % sont des *Podoviridae* et possèdent une courte queue (Sharp, 2001). La morphologie et le type de génome (ADN ou ARN) des autres familles de bactériophages (10 % restant), varie grandement.

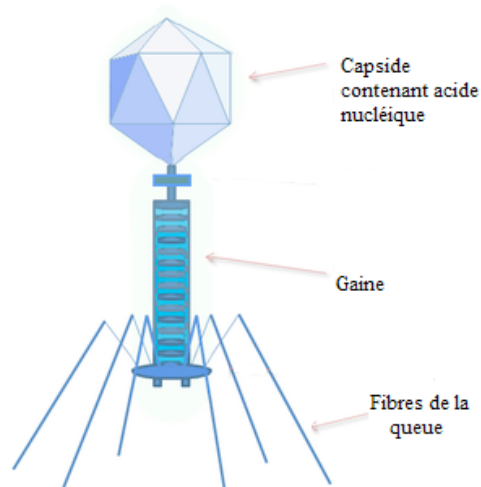


Figure 1.1 : Bactériophage et ses principales composantes. © Ecolyse inc, 2015. Reproduit avec permission

1.4.3 Mécanismes d'action

Les bactériophages ont été découverts indépendamment par le bactériologiste anglais Frederick Twort en 1915 et par le biologiste canadien Félix d'Hérelle en 1917 qui les baptisa « bactériophages ». Ils ont été rapidement utilisés pour traiter des infections bactériennes chez l'homme. Cependant, pour plusieurs raisons et notamment la découverte des antibiotiques, ce type de traitement s'est peu développé en Occident. Son efficacité semble pourtant établie chez l'homme, car ce traitement est régulièrement employé depuis des décennies dans certains pays de l'Europe de l'Est.

Pour qu'un bactériophage puisse infecter une bactérie, l'adhésion du bactériophage à la paroi bactérienne est la première étape et surtout la partie cruciale du processus. On dit que la spécificité de l'infection par le bactériophage est définie à cette étape précise. La pénétration du bactériophage dans la cellule hôte est une étape essentielle pour la continuation de son cycle de vie, car comme tous les virus, les bactériophages sont des parasites intracellulaires obligatoires. (Rakhuba, Kolomiets, Dey, & Novik, 2010).

Un type de bactériophage précis ne peut infecter qu'une espèce ou qu'une souche de bactéries très spécifique. La spécificité de cette interaction est dictée par la capacité d'adsorption qui elle, est directement en lien avec le type de récepteurs présents sur la paroi cellulaire

bactérienne. En plus du type de récepteurs, leur localisation et leur densité sur la paroi peuvent aussi influencer l'étape d'adsorption. Les différentes compositions des membranes cellulaires des bactéries à gram-positif et négatif vont influencer le type de bactériophage qui peut s'y attacher.

1. Récepteurs localisés sur la paroi cellulaire des bactéries à gram-négatif

La membrane externe des bactéries à gram-négatif augmente la perméabilité de la bactérie en raison de la présence des nombreux canaux de transport formés par des protéines. Aussi, on retrouve dans la membrane externe, des lipopolysaccharides (LPS), qui sont exclusifs aux bactéries à gram-négatif. Les protéines canaux de transport et les LPS sont les deux types de récepteurs qui sont reconnus par les phages spécifiques aux bactéries à gram-négatif. Certains phages vont interagir avec les LPS, d'autres avec les récepteurs protéiniques des canaux de transport et certains vont interagir avec les deux composantes.

a. Récepteurs de lipopolysaccharides

Les LPS contiennent un antigène O (spécifique d'une espèce à l'autre), un core ainsi qu'un lipide-A. Il existe deux types de LPS : R (rough) et S (smooth). Le type R ne contient que le core et le lipide-A, le rendant moins variable d'une espèce à l'autre. Certains bactériophages vont adhérer aux deux types de LPS alors que d'autres auront une spécificité pour les LPS type R ou les LPS type S. Les bactériophages qui reconnaissent les LPS-R sont moins spécifiques et peuvent donc s'attacher à différentes espèces bactériennes. Les bactériophages reconnaissant les LPS type S sont alors beaucoup plus spécifiques en raison de la présence de l'antigène O qui est variable d'une espèce à l'autre (Rakhuba et al., 2010).

2. Récepteurs localisés sur la paroi cellulaire des bactéries à gram-positif

La structure de la paroi cellulaire des bactéries à gram-positif diffère de la structure retrouvée chez les bactéries à gram-négatif. Quarante à 90% de la paroi cellulaire est composée de peptidoglycane. Un type de molécule intégré au peptidoglycane est l'acide téichoïque. L'acide téichoïque traverse de manière perpendiculaire la membrane plasmique. Les phages spécifiques aux bactéries à gram-positif utilisent généralement une des composantes du peptidoglycan, comme l'acide téichoïque, comme récepteurs (Rakhuba et al., 2010).

La vitesse d'adsorption du bactériophage par la bactérie est grandement influencée par la concentration des deux protagonistes. Comme les bactériophages ne sont pas mobiles, la collision

bactériophage-bactérie est responsable de l'adsorption. D'autres facteurs peuvent aussi influencer la vitesse d'adsorption comme le pH, la température, les ions et la présence de certaines substances dans le média. Certains phages nécessitent des cofacteurs tels que le calcium ou le magnésium pour que l'attachement se fasse de manière optimale et irréversible. Comme mentionné plus haut, l'adsorption des phages aux bactéries se fait de manière spécifique et requiert que les bons récepteurs soient présents aux bons endroits. En plus, ils doivent être présents en assez grand nombre et positionnés de manière à ce que les fibres caudales du phage puissent bien les reconnaître pour débiter le processus de pénétration (Rakhuba et al.,).

L'adsorption se fait habituellement en deux étapes : le stage réversible et le stage irréversible. De manière générale, l'introduction des acides nucléiques dans la bactérie hôte se fait lors de la phase irréversible. La séquence d'adsorption diffère d'un phage à l'autre. Par exemple, pour le phage T4, le cycle d'infection est initié par l'interaction entre les fibres caudales longues (LTF) du phage avec les lipopolysaccharides et les protéines OmpC (outer membrane protein C) de la bactérie. Cette interaction est réversible, mais lorsque 3 LTF sont liées avec leurs récepteurs respectifs, un changement de conformation se fait, ce qui signale au plateau du phage que l'attachement à la membrane de la bactérie a réussi. Le plateau est alors amené à proximité de la membrane cellulaire et les fibres caudales courtes (STF) du phage peuvent s'y attacher pour interagir avec leurs récepteurs spécifiques. Finalement, le plateau va glisser le long de la membrane jusqu'à trouver le site d'injection et il y a compression de la gaine contractile de la queue du phage. Finalement, l'axe central rigide de la queue du phage traverse alors la paroi cellulaire d'*E. coli* et l'injection du matériel génétique peut débiter (Rossmann, Mesyanzhinov, Arisaka, & Leiman, 2004).

Une fois l'attachement devenu irréversible, le génome du phage est transporté à travers les fibres caudales dans la cellule hôte. De manière générale, le bout de la queue du phage utilise un mécanisme enzymatique pour pénétrer le peptidoglycane et ainsi toucher ou pénétrer la membrane interne et ainsi libérer le génome directement dans la cellule. L'attachement de la queue à la paroi cellulaire désactive aussi le mécanisme qui empêchait la libération du matériel génétique de la capsid avant l'étape de l'adhésion. Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, plusieurs types de phages font une circularisation du génome de manière à éviter l'attaque des enzymes de la cellule hôte, ou ils protègent les extrémités de leur génome linéaire (Rossman et

al., 2004). C'est ici que les phages se distinguent selon le type de cycle qu'ils vont entreprendre : lytique ou lysogénique (figure 1.2).

Il existe deux types de phages nommés selon leur type de cycle d'infection: les phages lytiques et les phages lysogéniques. Les phages lytiques débutent l'infection en se fixant à la bactérie en utilisant des récepteurs spécifiques à cette dernière et en injectant leur matériel génétique à l'intérieur de la bactérie. C'est à ce moment que le phage prend avantage de la bactérie en utilisant sa machinerie pour pouvoir répliquer son matériel génétique et exprimer les protéines nécessaires à l'assemblage de nouvelles particules de phages. La production de nouvelles particules de phages amènera la lyse de la bactérie hôte et les phages seront libérés dans l'environnement, permettant ainsi l'infection de d'autres bactéries présentes promouvant la continuation du cycle d'infection. D'autres phages, aussi appelés tempérés, peuvent infecter les bactéries pour ensuite débiter un cycle latent, soit la lysogénie. Dans ce cas, au lieu d'avoir une réplication du génome du phage, il y a incorporation du génome viral dans celui de la bactérie et le génome est répliqué en même temps que les chromosomes de la cellule hôte. Il est alors transmis à chaque cellule fille produite lors de la division cellulaire. On appelle « prophage » l'état latent où le génome du phage est silencieux et n'est pas exprimé. Il est possible pour les phages lysogéniques de recevoir un signal, comme par exemple l'altération de l'ADN ou la lumière UV par exemple, et d'entrer dans le cycle lytique. Si un tel évènement se produit, il peut y avoir une excision non précise du prophage incorporant ainsi un morceau de l'ADN de la bactérie hôte dans ce dernier. Un phage transducteur est alors produit et une des conséquences de cette mauvaise excision est qu'une partie de l'ADN bactérien pourrait être recombinée dans les autres bactéries que le phage va infecter, changeant ainsi leur génome original et peut-être leurs propriétés. Il y a alors un échange de génétique bactérienne dans la nature (Kutter & Sulakvelidze, 2005).

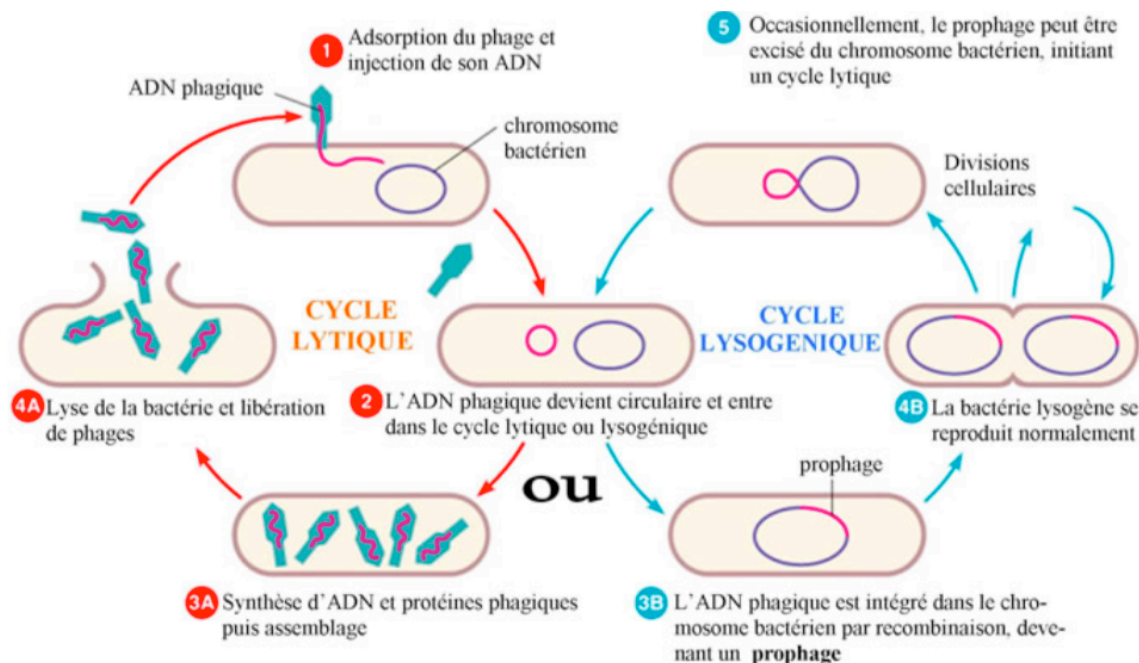


Figure 1.2 : Cycle lytique et cycle lysogénique des bactériophages © Brigitte Veron, 2015. Reproduit avec permission.

1.4.4 Stabilité des bactériophages

La stabilité des phages et leur survie peuvent être influencées par plusieurs facteurs, qu'ils soient chimiques ou physiques. Certains scientifiques proposent aussi un lien entre la morphologie de certains phages et leur capacité de survie dans différentes conditions. Une meilleure compréhension de la sensibilité des phages aux facteurs extérieurs peut être utile pour leur utilisation dans le milieu pharmaceutique, de l'agriculture ou simplement pour les gens qui travaillent de manière quotidienne avec ces derniers. (Jończyk et al., 2011). Chaque type de phage réagit différemment et les conditions doivent être déterminées de manière expérimentale pour chacun. Il existe par contre certains principes généraux qui s'appliquent à la majorité des bactériophages. Ackermann, Tremblay et Moineau (2004) ont su démontrer que les phages possédant des fibres caudales semblent plus stables dans des conditions difficiles. Par contre, il ne semble pas y avoir de différences notables entre les types de fibres caudales (flexible, contractile ou courte). Par contre, les phages avec une plus grosse capsid (100 nm) ont une meilleure capacité d'adaptation à différents milieux que ceux ayant une capsid plus petite (60 nm).

La température est un facteur décisif pour la capacité de survie des phages. Elle joue un rôle fondamental pour l'attachement du phage à la bactérie, la pénétration, la multiplication et peut influencer la durée du cycle latent (lysogénie) des phages. De manière générale, des températures plus basses que les températures optimales peuvent diminuer la quantité de matériel génétique qui est injecté dans les bactéries alors que des températures plus élevées rallongent le cycle de latence (Jończyk et al., 2011).

Dans la plupart des cas, les phages sont stables à un pH de 5 à 8. On rapporte certaines espèces qui survivent à un pH de 3 ou 4, d'où l'importance d'étudier chaque type de phages. Généralement, le titre (concentration) du phage va décroître lentement en même temps que le pH. Par exemple, le titre du phage *S. aureus* a été diminué de deux log entre 4 et 6 heures de temps lorsque le pH passait de 6,19 à 5,38. La prolifération de plusieurs phages est altérée lorsque le pH est inférieur à 4,5. Le phage T4 est instable à un pH plus bas que 5 alors que le phage PM2 perd complètement son activité après une heure dans une solution à un pH de 5 à 37 °C. On peut donc penser que si des phages étaient ingérés pour traiter une infection, l'acidité de l'estomac pourrait inactiver certains phages les rendant alors inefficaces (Ly-Chatain, 2014).

Les phages sont aussi sensibles aux agents dénaturants de protéines comme l'urée et l'uréthane, mais le degré d'inactivation dépend aussi de la concentration et de la température de ces derniers. De manière générale, les détergents ont moins d'effets sur les phages que sur les bactéries alors que les agents de chélation peuvent impacter certains types de phages beaucoup plus que d'autres. Cela dépend majoritairement des cofacteurs nécessaires à l'adsorption. Tous les phages sont sensibles aux rayons UV, spécifiquement ceux de la gamme du 260 nm (UVC) ainsi que les ultraviolets lointains (122-200nm). En plus des rayons solaires, il y a plusieurs rapports d'une perte de viabilité des phages due à la lumière fluorescente des réfrigérateurs. Les agents mutagènes, comme le gaz moutarde, l'acide nitrique et les UV inactivent les phages et peuvent induire le cycle lytique chez les lysogènes (Kutter & Sulakvelidze 2005).

1.4.5 Avantages de l'utilisation des bactériophages

L'utilisation de phages en phagothérapie et dans d'autres applications a plusieurs avantages comme le fait que les phages sont efficaces contre les bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques. Ceci est dû au fait que le mécanisme d'induction de la lyse des bactéries est complètement différent de celui créé par les antibiotiques. De plus, l'apparition de bactéries

résistantes aux phages liée aux modifications de protéines de surface n'est pas un grand problème parce que les phages, tout comme les bactéries, ont la capacité de muter aussi et pourront ainsi détourner cette mutation en modifiant leurs protéines d'arrimage (Matsuazaki et al., 2005). Les coûts reliés au développement d'un traitement avec des phages sont beaucoup moins élevés que ceux reliés à la découverte et au développement de nouveaux antibiotiques (Matsuazaki et al., 2005). Aussi, la production de phages est un processus plutôt rapide qui peut se faire en quelques jours voire quelques semaines (Matsuazaki et al., 2005). La rapidité de production est un grand avantage lorsqu'on compare à la découverte d'antibiotiques qui prend plusieurs années (Sulakvelidze, Alavidze, & Morris, 2001). La capacité des phages de croître de façon exponentielle au site d'infection est aussi un avantage. En effet, les phages vont croître au même rythme que leur hôte jusqu'à la disparition de ce dernier (Pisiri, 2000). Leur capacité de croissance exponentielle permet aussi l'utilisation d'une petite dose pour donner l'effet thérapeutique optimal (Sulakvelidze et al., 2001). En effet, théoriquement, une seule dose de phage serait nécessaire pour traiter une infection (Barrow & Soothill, 1997). Finalement, contrairement aux antibiotiques habituels qui peuvent fragiliser ou détruire une partie de la flore microbienne intestinale, la spécificité des phages pour une bactérie hôte fait en sorte qu'ils attaquent seulement les bactéries cibles et laissent les bactéries bénéfiques en place. Les effets secondaires typiques des antibiotiques telles que les infections à la levure et la diarrhée sont rarement présents avec l'utilisation de phages (Pisiri, 2000).

1.4.6 Utilisations actuelles

Les bactériophages ont été découverts il y a près de 100 ans et la problématique de la résistance bactérienne aux antibiotiques est venue raviver l'intérêt de la communauté scientifique pour ces derniers; que ce soit dans le domaine agroalimentaire, vétérinaire ou en soins de santé.

Phagothérapie

La vente de phages aux États-Unis a été vue pour la première fois en 1940 par la compagnie Eli Lilly qui produisait sept différentes préparations. Elles étaient utilisées contre les staphylocoques, les streptocoques, *Escherichia coli* et d'autres bactéries pathogènes. Ces préparations venaient sous deux formes soit un bouillon stérile ou sous forme de gel soluble. Plusieurs infections pouvaient être traitées par ces préparations tels les abcès, les plaies purulentes, les vaginites, les infections aiguës ou chroniques des voies respiratoires ou les

infections de la mastoïde (Sulakvelidze et al., 2001). D'autres compagnies telles que E.R Squibb et Sons and Swan-Myers étaient impliquées dans la commercialisation des phages. Par contre, l'efficacité des phages était controversée, car on ne connaissait pas encore l'existence des deux types de phages, rendant le succès du traitement aléatoire. Aujourd'hui, avec le contrôle de qualité nous sommes en mesure de produire des cocktails de phages plus sécuritaires et efficaces. À l'époque, le lobby des pharmaceutiques qui ont développé les antibiotiques a mené à l'arrêt de l'utilisation des phages sauf en Europe de l'est et en URSS (Sulakvelidze et al., 2001). En Pologne, les préparations de phages étaient habituellement administrées lorsque les patients ne répondaient plus au traitement antibiotique. On les administrait de manière orale trois fois par jour ou de façon topique, directement sur les plaies. Des suspensions de phages pouvaient aussi être données par gouttes dans les yeux, le nez ou les oreilles (O'Flaherty, Ross, & Coffey 2009). Le phénomène répandu de résistance aux antibiotiques demande des solutions alternatives pour traiter les infections et la phagothérapie a connu un nouvel essor dans les dernières décennies, amenant plusieurs compagnies à réinvestir en recherche dans ce domaine. De nos jours, on parle de thérapie monophage lorsqu'un seul type de phage est utilisé pour traiter une infection et de thérapie multiphages lorsqu'un cocktail est utilisé. L'utilisation d'un cocktail de phage est souvent priorisée à l'utilisation d'un seul phage, car le cocktail permet d'augmenter les chances de bonne combinaison phage-bactérie et donc augmente les chances de succès du traitement.

En 2005, l'institut Hirszfild, une clinique de phagothérapie, a vu le jour à Wroclaw en Pologne. Cette institution est légiférée par l'Union Européenne et facilite les essais cliniques humains pour l'utilisation des phages comme agent thérapeutique. En 2012, un rapport a été publié analysant l'efficacité et l'innocuité de la phagothérapie chez 153 patients traités entre janvier 2008 et décembre 2010. Ces 153 patients souffraient d'infections d'un large éventail et étaient tous résistants au traitement habituel par antibiotiques. L'élimination complète du pathogène a été notée chez 18% des patients alors qu'une réponse clinique positive a été vue chez 40% d'entre eux. Moins de 4% des patients n'ont pas terminé l'essai en raison d'effets secondaires (Miedzybrodzki et al., 2012).

Au Royaume-Uni, la compagnie Biocontrol Limited a décidé d'étudier l'utilisation des phages contre *P. aeruginosa* pour le traitement des otites chroniques. Lors des otites chroniques, les bactéries sont souvent organisées en biofilm les rendant moins susceptibles aux antibiotiques et aux cellules du système immunitaire. La compagnie a obtenu des résultats intéressants pour le

traitement des infections d'oreilles causées par *P. aeruginosa* chez les chiens, ce qui leur a donné l'approbation réglementaire de différentes agences gouvernementales pour poursuivre l'étude en phase I et II chez les humains. Vingt-quatre patients, âgés entre 2 et 58 ans, souffrant d'otites chroniques causées par une souche de *P. aeruginosa* résistant aux antibiotiques ont été choisis pour faire partie de l'étude. Les patients ont été divisés en deux groupes; un groupe placebo recevant une solution de saline tamponnée de glycérolphosphate 10% et un groupe recevant le cocktail de 6 phages anti- *P. aeruginosa* à une concentration de 10^5 UFP/mL. Un volume de 0,2 mL des deux suspensions était administré aux patients directement dans l'oreille. Aucun autre traitement n'était inclus dans cette étude. Les résultats ont démontrés que le nombre de bactéries avait diminué de 80 % dans le groupe traité par les phages alors qu'il avait augmenté légèrement dans le groupe placebo (Kutter et al., 2010).

Plus récemment, la corporation Nestlé a complété deux essais cliniques de phase I en Suisse et au Bangladesh visant à administrer le phage T4 d'*E. coli* à 15 volontaires en santé pour tester son innocuité. Tous les traitements ont été bien tolérés et Nestlé a récemment terminé un essai clinique au Bangladesh pour tester l'efficacité et l'innocuité de la prise orale d'un cocktail de phage T4 pour le traitement de la diarrhée associée à l'infection par *E. coli* chez les enfants. Plus de 450 enfants ont été enrôlés et ils ont été divisés en trois groupes : un groupe recevant le cocktail de phage T4, un groupe recevant le cocktail de phage « Microgen » à la dose recommandée par le fabricant (Russie) et un groupe placebo recevant une solution de réhydratation orale. L'administration a duré 5 jours dans les trois groupes. Les résultats de l'étude n'ont pas encore été publiés, mais s'ils sont concluants, cet essai clinique sera une pierre angulaire pour l'avancement de la phagothérapie, car c'est le premier essai clinique de grande envergure qui adhère avec toutes les réglementations européennes ET américaines (Nestlé Corporation, 2013).

Sur le site www.clinicaltrials.gov, un site regroupant les essais cliniques répertoriés aux Etats-Unis, plus de 19 essais sont en cours ou ont été complétés dans les dernières années pour l'utilisation de bactériophages comme agent thérapeutique (dont celui de Nestlé Corporation mentionné ci-haut). La collecte d'information de ces 19 études (faites sous législation et réglementations américaines) contribuera au développement de la phagothérapie dans l'hémisphère ouest. Les résultats de ces études sont attendus dans les prochaines années.

Malgré plusieurs avantages et résultats d'études encourageants, certaines limites et restrictions restent à être surmontées. Pour l'instant, le dosage, la voie d'administration, la fréquence et la durée de traitements sont des paramètres qui restent variables et qui doivent être définis avant de pousser les études cliniques plus loin. Plusieurs limites doivent être considérées avec l'utilisation des phages, mais il existe certaines solutions pour surpasser ces limites. Un des avantages de l'utilisation des phages est le fait que ces derniers soient très spécifiques. Par contre, cet avantage peut aussi s'avérer une limite dans le cas où plus d'une souche de bactéries est présente chez le patient à traiter. Dans ce cas, un cocktail de phages doit être utilisé de manière à pouvoir éliminer l'infection (Wittebole, De Roock, Opal, 2014). De plus, avant de commencer un traitement avec phages, il est impératif de bien diagnostiquer quelle(s) bactérie(s) est(sont) présente(s). En effet, un isolement de la souche bactérienne doit être fait pour pouvoir prescrire le phage adéquat. Dans une situation où l'infection chez le patient est dangereuse et menace sa vie, le temps nécessaire pour isoler la souche pourrait être un facteur critique dans la guérison de ce dernier. Les antibiotiques agissent dans un plus grand spectre et ne requiert pas une analyse aussi complète de l'infection dans des cas comme celui-ci. Une solution serait de développer un phage « multivalent » qui aurait la capacité de faire la lyse de la majorité des souches d'une espèce pathogène. Il faudrait donc élargir le spectre d'action des phages de manière à les rendre efficaces contre le plus de souches possibles (Carlton, 1999). Une autre solution serait de créer un cocktail de phages qui serait spécifique pour les souches les plus communes et dangereuses d'une espèce en particulier. Un pool de phages a été développé dans les années 1980 pour les souches d'*E. coli* qui sont enterotoxigéniques. Cette approche est aussi pratique lorsque des bactéries résistantes à un phage se développent, car ces bactéries risquent d'être susceptibles aux autres phages présents dans le cocktail (Barrow & Soothill, 1997). Un autre problème avec les phages est le fait qu'ils sont éliminés rapidement du corps humain (Donlan, 2009). En effet, les phages sont considérés comme étant des antigènes et ils déclenchent l'action du système immunitaire lorsqu'ils sont utilisés. Lorsque les phages sont en contact avec le système immunitaire pour la première fois, ce n'est pas l'action des anticorps qui est le problème, mais bien l'élimination par la rate, le foie et les autres organes « filtrants » (Wittebole et al., 2014). Des phages appelés « long-circulating » ont été développés de manière à rester dans le corps plus longtemps que les phages dit « wild-type ». (Pisiri, 2000) Ces phages sont créés en faisant des variations mineures sur les protéines de l'enveloppe de manière à ce qu'ils soient plus difficilement reconnus par les organes et

puissent donc circuler plus longtemps dans le corps. Lorsqu'une infection chronique est présente chez le patient et qu'une utilisation répétée de phages est nécessaire, des anticorps contre les phages vont être produits et risquent de réduire l'efficacité des traitements suivants. Une solution simple est d'utiliser une plus grande dose de phages pour compenser pour ceux qui vont être neutralisés par les anticorps. Une autre limite est la libération dans l'organisme de substances bactériennes, comme les endotoxines des bactéries à gram-négatif, lors de la lyse des bactéries par les phages à la fin de leur cycle de reproduction. Ces substances pourraient être responsables de plusieurs effets secondaires chez le patient comme le déclenchement de la cascade d'inflammation qui pourrait finir par une défaillance des organes vitaux. Finalement, une des limites les plus importantes de l'utilisation des phages pour traiter les infections chez l'humain est la possibilité que les bactéries deviennent résistantes aux phages, comme elles peuvent l'être aux antibiotiques. Il existe au moins 3 mécanismes qui pourraient être impliqués dans le phénomène de résistance aux phages. On parle de perte de récepteurs bactériens (changements dans la composition de la surface bactérienne), de modifications structurales des récepteurs sur la paroi bactérienne (changement de conformation de certains récepteurs) et de masquage de récepteurs (sécrétion par la bactérie de substances pouvant masquer les récepteurs). Tous ces changements préviendraient l'adsorption des phages aux bactéries et donc la formation de nouvelles particules de phage à travers le cycle lytique (Wittebole et al., 2014). Les bactéries pourraient aussi acquérir suite à la transduction, un système de restriction/modification qui dégraderait l'acide nucléique du phage une fois injecté dans la cellule hôte (Ly-Chatain, 2014). Par contre, la résistance aux phages par les bactéries est 10 fois plus lente à développer que la résistance aux antibiotiques ce qui en fait une problématique moins dramatique (Qadir, 2015).

Utilisation pour le contrôle des biofilms

Les bactériophages ont été considérés comme agent contre les biofilms. Les enzymes présents sur les phages ont la capacité de dégrader les exopolysaccharides des biofilms, les rendant alors plus perméables et empêchant alors leur développement (Azizian et al., 2013). Par contre, l'effet des phages sur les biofilm déjà formés est plutôt faible (Azizian et al., 2013). Cela est dû au fait que les phages sont très spécifiques quant aux récepteurs bactériens avec lesquels ils interagissent et si ces derniers ont été modifiés en raison de la formation du biofilm, ils ne pourront infecter les bactéries présentes dans le biofilm (Azizian et al., 2013).

Dans une étude de Sillankorva & al (2004), une diminution de 85 % de la masse du biofilm composé de *P. fluorescens* a été étudiée après un traitement avec le phage Φ S1 (O'Flaherty et al., 2009). Certains phages ont même été modifiés de manière à exprimer l'enzyme DspB qui hydrolyse une adhésion cruciale pour la formation de biofilms par *S. aureus* et *E. coli*. Le phage modifié T7 a réduit le compte bactérien du biofilm de *E. coli* de 99 % (Lu & Collins, 2007).

L'utilisation de phages en concomitance avec d'autres substances utilisées pour traiter les biofilms a été testée. Par exemple, l'utilisation d'un phage *Listeria* avec un ammonium quaternaire a démontré un effet de synergie où une diminution importante de *L. monocytogenes* a été observée sur des surfaces d'acier inoxydable et de polypropylène (O'Flaherty et al., 2009).

Toutes ces études démontrent le réel potentiel des phages pour la prévention et le contrôle de la formation de biofilms. Il est nécessaire de continuer les recherches afin de mettre au point les bonnes recettes de phage et d'enzymes de phages qui pourraient être utilisées pour cette application.

Utilisation en agroalimentaire

Le contrôle des pathogènes qui sont présents sur les fruits et les légumes est d'un grand intérêt, car ces aliments ne sont habituellement pas transformés ou cuits de manière à tuer ces pathogènes. Plusieurs études ont démontré l'efficacité des phages pour l'élimination des pathogènes sur les aliments prêts à être consommés. Citons comme exemple l'utilisation de phage contre *C. jejuni* sur la peau de poulets conservés à 4 °C et à -20 °C. Une diminution d'un facteur de 10 a été observée chez les poulets à 4 °C et une diminution de 2,5 log a été mesurée chez les poulets à -20 °C (Atterbury, Connerton, Dodd, Rees, & Connerton, 2003). Un autre groupe a inoculé des peaux de poulet avec 10^4 CFU/mL de *C. jejuni* suivi par l'administration de phages (10^6 PFU/cm²). Une diminution de 95 % de *C. jejuni* a été observée! Ce même groupe a aussi étudié la réduction de *S. enterica* sur les peaux de poulets. Une diminution de 99 % de la présence bactérienne a été observée sur les peaux qui avaient été traitées par les phages, comparé aux peaux « contrôles » qui n'avaient pas été traitées par les phages (Goode, Allen, & Barrow, 2003). Ces études ne sont que deux exemples parmi des dizaines qui démontrent l'efficacité des phages pour diminuer la présence bactérienne sur nos aliments.

Un autre aspect important dans le domaine agroalimentaire est la durée de conservation des aliments. L'utilisation des phages a aussi été étudiée dans ce contexte. Greer & Dilts (2002) ont su faire augmenter la durée de conservation du porc de 4 à 8 jours en utilisant des phages anti-*Brochothrix thermosphacta*. Dans une autre étude, l'utilisation d'un cocktail de coliphages a su diminuer, voir éliminer, les bactéries *E. coli* O157:H7 sur les viandes (Tomat, Migliore, Aquili, Quiberoni, & Balagué, 2013).

Une étude menée par Bigwood et al. (2008) a démontré l'efficacité des phages pour réduire la densité bactérienne sur des échantillons de viandes crues. En effet, des phages anti-*Salmonella typhimurium* PT160 et anti-*Campylobacter jejuni*, à différentes multiplicités d'infection (10 ou 10^4 UFP/mL), ont été ajoutés à des densités bactériennes (<100 ou 10^4 CFU/cm²) inoculées sur du bœuf cru et cuit. Les échantillons étaient ensuite incubés à 5 °C et 24 °C pour simuler des conditions de réfrigération et de température pièce. Dans les conditions optimales, multiplicité d'infection (ratio phage :bactérie) élevée et densité bactérienne élevée, une inactivation des bactéries de l'ordre de 2-3 log à 5 °C et de $>5,9$ log à 24 °C ont été observées lorsque comparé aux échantillons qui n'avaient pas été en contact avec les phages. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que les bactériophages pourraient être utiles pour le contrôle des pathogènes d'origine alimentaire (Bigwood, Hudson, Billington, Carey-Smith, & Heinemann 2008).

L'utilisation dans le domaine agroalimentaire est très prometteur et plusieurs compagnies sont entrain de développer, ou ont déjà développé, des préparations de phages qui pourraient être utilisées dans ce milieu. (O'Flaherty et al., 2009).

Applications vétérinaires

L'utilisation des phages contre les infections animales ainsi que pour prévenir la transmission des pathogènes des animaux au système agroalimentaire est une autre sphère importante de la recherche avec les phages (Adhya, Merril, & Biswas, 2014). Une expérience faite par Smith & Huggins dans les années 80 a démontré l'efficacité d'une suspension de phage administrée de manière intramusculaire à des souris qui avait été infectées par *E. coli*. L'administration d'une seule dose de suspension de phage a été plus efficace que les multiples administrations d'antibiotiques qui avaient été donnés aux souris. Ce même groupe de recherche a utilisé les phages pour prévenir la diarrhée causée par *E. coli* chez des veaux, des porcelets et

des agneaux (Wittebole et al., 2014). Les applications dans le milieu agroalimentaire et vétérinaires sont vastes et gagnent à être exploitées. Pour l'instant, la réglementation n'est pas aussi rigoureuse que dans pour les applications thérapeutiques humaines, ce qui en fait un domaine en pleine évolution.

Utilisation de l'enzyme lytique comme agent thérapeutique

L'enzyme lytique est utilisée par les bactériophages pour décomposer la paroi cellulaire des bactéries lors de son cycle d'infection et pourrait avoir le potentiel d'être utilisé comme agent thérapeutique (O'Flaherty et al., 2009). Le mécanisme d'action de l'enzyme lytique est l'hydrolyse des quatre plus importants liens chimiques du peptidoglycane, créant ainsi des trous dans la membrane, qui sont mortels pour la bactérie (Gandham, 2015). Le « Center for Disease Control and Prevention » aux États-Unis a décrété que *Listeria*, *Salmonella*, *E. coli* et *C. jejuni* sont les principaux pathogènes responsables des décès d'origine alimentaire. C'est pourquoi la majorité des études faites portent sur ces pathogènes. Des produits sont déjà approuvés aux États-Unis par le « Food and Drug Administration » pour l'utilisation de phage ou de leur enzyme lytique sur les produits alimentaire prêts à être consommer comme le LMP-102 utilisé contre *L. monocytogenes* pour la volaille et la viande avant l'emballage. Listex P100 a démontré une activité anti-*L. monocytogenes* sur le saumon cru ainsi que sur les viandes et le fromage. (Mahony, McAuliffe, Ross, & Van Sinderen 2011). Finalement, ECP-100 (Ecoshield) est utilisé pour prévenir la contamination par *E. coli* 0157 :H7 sur la viande hachée ainsi que les fruits et légumes (Ly-Chatain, 2014).

Au niveau expérimental, les enzymes lytiques des bactériophages sont aussi étudiées contre *Enterococci faecalis* et les autres espèces d'entérocoques. EC300 a été développé pour éliminer les bactéries *E. faecalis* dans des conditions idéales de croissance (Proença, Leandro, Garcia, Pimentel, & São-José, 2015). Les résultats démontrent une efficacité de l'enzyme EC300 contre une variété de souches de *E. faecalis*, incluant des souches résistantes aux antibiotiques (Proença et al., 2015). L'utilisation des enzymes lytiques comme agent thérapeutique est de plus en plus étudiée et des résultats concluants semblent ressortir de ces études.

1.4.7 Mécanismes de défense des bactériophages

Comme mentionné plus haut, lorsque les bactéries sont en contact avec des bactériophages pour une certaine période de temps, elles peuvent développer des mécanismes de résistance pour survivre à l'infection par les phages. Le développement de la résistance bactérienne contre les phages est 10 fois plus lent à survenir que celui qui est développé contre les antibiotiques. Lorsqu'une résistance contre un antibiotique est développée, il devient alors difficile de la contrer compte tenu que les molécules antibiotiques sont statiques. Par contre, avec les phages, lorsqu'une résistance est créée, les phages peuvent eux aussi développer des mécanismes de défense pour contre la résistance bactérienne (Samson, Magadán, Sabri, & Moineau, 2013). La diversité des bactériophages est déterminée par leur adaptation dynamique aux changements, dont la résistance bactérienne. Les mécanismes de résistance les plus utilisés par les bactéries vont être présentés ci-dessus, et la contre-attaque des phages sera aussi expliquée.

Prévention de l'adsorption

La première étape de l'infection par le phage est l'adsorption à la bactérie. Cette étape se fait lorsque les récepteurs présents sur le phage s'attachent à leurs protéines spécifiques sur la bactérie. Les bactéries peuvent résister à l'infection en changeant la disponibilité des protéines présentent sur leur surface, empêchant ainsi la liaison spécifique nécessaire pour l'adhésion. Par contre, les phages peuvent aussi modifier leurs récepteurs pour pouvoir reconnaître un autre type de protéines. Les bactéries peuvent faire subir une mutation aux protéines qu'elles expriment de manière à empêcher encore une fois l'adsorption. Par contre, les phages ont la capacité d'évoluer de manière à reconnaître la forme altérée de la protéine cible (Labrie, Samson, & Moineau, 2010; Samson et al., 2013).

Dégradation des acides nucléiques du phage

Quand le génome du phage réussi à entrer dans la cellule bactérienne, il fait face à une multitude de barrières antivirales. Les systèmes de restriction-modification sont très répandus chez les bactéries. Ce système utilise une enzyme de restriction (endonucléase) qui dégrade l'ADN étranger à des sites spécifiques. La modification des sites de reconnaissances sur l'ADN bactérien prévient l'attaque par les endonucléases. Pour échapper au système de restriction-modification, les phages peuvent enlever les sites de reconnaissance par les endonucléases sur

l'ADN. Ce processus se fait par l'accumulation de mutations et rend donc le phage résistant à l'attaque des enzymes responsables de la dégradation de l'ADN étranger. Ce mécanisme permet donc au phage de bien infecter la bactérie et de pouvoir continuer son cycle lytique (Samson et al., 2013).

Systèmes d'infection ratée

Le système d'infection ratée inhibe plusieurs étapes de la réplication du génome du phage et contrairement aux autres systèmes, il peut provoquer la mort de la cellule hôte. Il existe plusieurs systèmes d'infection ratée, on en retrouve plus de 23 chez les différentes espèces de *L. lactis*. Le système toxine-antitoxine fait partie de la grande famille des infections ratées. Ce système provoque la mort de la cellule hôte (ou sa dormance) et est activé après l'infection par le phage. Le système est composé d'une toxine et d'une antitoxine neutralisante qui rend la toxine inefficace lors de la croissance bactérienne normale. Lorsque la bactérie subit un stress (comme l'infection par un phage), l'antitoxine est dégradée et la toxine peut induire le cycle de dormance ou la mort cellulaire. Certains phages ont la capacité de répliquer l'antitoxine de manière à empêcher l'activation de la toxine et donc la dormance/mort bactérienne (Samson et al., 2013).

Comme on peut le voir, les phages ont la capacité de contrer les mécanismes de défense des bactéries ce qui en fait un bon candidat pour une utilisation antimicrobienne. Les antibiotiques n'ont pas la capacité de s'adapter à leur environnement et c'est pourquoi la résistance à ces derniers est maintenant une problématique très importante. Les bactériophages sont une excellente alternative et fournissent des avantages que les antibiotiques n'ont pas.

CHAPITRE 2 OBJECTIFS

Il n'y a aucun doute que les infections nosocomiales sont un problème de santé publique au niveau mondial et que de nouvelles pistes de solutions doivent être développées de manière à en réduire les impacts. Rappelons que le problème de croissance des IN est attribué majoritairement au vieillissement de la population, à la promiscuité des patients dans les hôpitaux, à l'émergence de nouvelles souches bactériennes ou de souches résistantes aux traitements déjà utilisés, aux carences au niveau de l'entretien des surfaces ainsi qu'à l'utilisation abusive d'antibiotiques à large spectre.

Plusieurs mesures doivent être appliquées pour s'assurer de diminuer le taux de contamination des patients et de leur environnement. Une des pistes de solutions pourrait être l'ajout de suspensions de phages au régime de nettoyage des surfaces dans les établissements de soins.

L'objectif général de ce projet de recherche est de sonder la faisabilité de l'utilisation des phages comme méthode de désinfection des surfaces. L'utilisation des phages serait écologique et sans danger pour les patients et les employés des établissements de soins.

Par contre, avant de pouvoir développer cette nouvelle méthode de désinfection, il est important de connaître et de comprendre les paramètres qui influencent l'activité et la survie des phages et de leur cible sur les surfaces. Les objectifs spécifiques liés à ce projet visent donc à :

- 1- Analyser le comportement d'une sélection d'espèces bactériennes sur les surfaces en situation de séchage.
- 2- Étudier le comportement d'une sélection de phages sur les surfaces après différents temps de séchage.
- 3- Mesurer l'efficacité de l'interaction phage-bactérie sur lesdites surfaces après séchage.

L'un des aspects originaux de ce travail de maîtrise est le développement d'une méthode de traitement de surfaces en utilisant une entité biologique (approche bioinspirée). Habituellement, ce sont majoritairement des composantes chimiques qui sont utilisées dans la production de produits de nettoyage et l'introduction d'une composante biologique pourrait rendre le produit moins dangereux pour l'environnement et les personnes qui l'utilisent. Les

bactériophages sont beaucoup plus étudiés et utilisés en Europe de l'Est et leur réintroduction dans le monde occidental demande plus de recherche et de diffusion des connaissances. L'acceptation par la population de l'utilisation d'entités biologiques dans des milieux publics devra être faite par compréhension du principe de base, d'où l'importance d'éduquer les gens sur le sujet. Les multiples avantages des bactériophages en font d'excellents candidats pour plusieurs indications.

CHAPITRE 3 MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les bactériophages ainsi que leurs bactéries hôtes ont été obtenus de la banque Félix d'Hérelle de l'Université Laval à Québec (équipe du Dr. Sykvain Moineau). L'amplification initiale des bactériophages a été faite chez Innu-Science à Trois-Rivières par le groupe de recherche du Dr. Yves Hurtubise. Innu-Science est une entreprise québécoise œuvrant dans le domaine de la biotechnologie et spécialisée dans le développement de produits nettoyants professionnels de haute performance. Les bactéries utilisées pour ce projet de recherche sont *Staphylococcus aureus* HER 1049 et 1474 ainsi que *Escherichia coli* B HER 1024. Leurs phages correspondants sont les phages P68, K et T4. L'utilisation d'une souche de *Staphylococcus aureus* susceptible à la méthicilline était moins risquée que l'utilisation de son homologue résistante aux antibiotiques pour le développement du protocole. C'est pourquoi nous avons choisi ces deux souches. Le principe de base s'applique au SARM et pourra être testé lorsque le protocole sera au point. Quant au choix d'*E. coli*, il était nécessaire d'avoir un point de comparaison pour nos expériences : *Escherichia coli* est un gram-négatif très étudié dans le domaine de la désinfection.

3.1 Stabilité des phages

La stabilité des phages est évaluée en les normalisant à une concentration de 10^8 UFP/ml (unité formatrice de plaque de lyse) dans le milieu TSB (tryptic soy broth), en les incubant à 4 °C et à température ambiante pour une durée de 2 mois ou jusqu'à ce que la préparation soit instable. La stabilité à 37 °C est vérifiée pendant une période de 4 semaines. La concentration des préparations est évaluée par titration en duplicata toutes les semaines. Lorsque le ratio (titre / titre initial) est plus petit que 0,2, et ce, deux fois consécutives, la préparation est considérée instable (Fortier & Moineau, 2009).

3.2 Absorbance des bactéries

Avant de commencer chaque expérience, l'échantillon original bactérien doit être standardisé : une absorbance de 0,70 à 600 nm. Ce paramètre a été atteint soit en ajustant la concentration de bactéries dans l'échantillon par dilution ou en laissant croître les bactéries dans une culture jusqu'à ce qu'elles atteignent la valeur voulue. Dans le premier cas, un volume de

TSB étaitensemencé avec les bactéries pour ensuite être incubé à 37 °C pour 24 heures. La valeur initiale d'absorbance était mesurée et les dilutions nécessaires étaient faites pour atteindre 0,70. Dans le deuxième cas, après l'incubation initiale à 37 °C, une dilution 1 :100 a été faite et l'échantillon était réincubé à 37 °C dans un bain-marie jusqu'à ce qu'il atteigne l'absorbance nécessaire. Les résultats n'ayant démontrés aucune différence significative, les deux techniques ont été utilisées alternativement au cours des expérimentations.

3.3 Titration des phages (Goutte et dilutions)

Pour déterminer la concentration d'un phage, la méthode des dilutions est utilisée alors que la méthode de la goutte est choisie pour vérifier la viabilité d'un échantillon de bactériophages. Dans les deux cas, pour que les tests fonctionnent, la culture bactérienne hôte du phage doit avoir originalement une absorbance d'environ 0.70 (0.6-1.0) à une densité optique de 600nm.

Goutte

En raison de sa simplicité et de sa reproductibilité pour répondre à la question sur la viabilité des bactériophages, nous avons retenu la technique dite de la Goutte telle que proposée par Félix d'Hérelle en 1917 et que nous avons adaptée pour les surfaces en acier inoxydable (Kutter & Sulakvelidze, 2005). Nous avons choisi de faire toutes les manipulations sur des surfaces d'acier inoxydable médical pour reproduire des conditions hospitalières. En effet, on retrouve ce type de matériel un peu partout dans les hôpitaux et c'est pourquoi nous l'avons choisi. Pour déterminer la viabilité de l'échantillon, un tapis bactérien doit d'abord être créé sur le pétri TSA (2.75 % tryptone soya broth, 0.6 % yeast extract, 2 % agar, 1.05 % glucose). Cinq cents uL de la culture bactérienne est ajouté à un tube contenant 4 mL d'agar mou (0.70 % d'agar) et est ensuite déposé sur la gélose contenant le milieu TSA. Après la solidification de la couche d'agar mou, des gouttes de 10 uL de phages dilués en série (10^{-3} à 10^{-8}) sont déposées sur le tapis bactérien. Les gouttes sont laissées à sécher pour environ 20 minutes sous la hotte à flux laminaire et la gélose est ensuite incubée à 37 °C pour 16 à 20 heures. Il est ensuite possible de voir à quelle dilution les phages produisent des plages de lyse distinctes et de faire une estimation de la concentration de phages présents dans l'échantillon.

Dilutions

Pour mesurer la viabilité des phages, c'est la technique des dilutions, elle aussi proposée par Félix d'Hérelle, qui a été retenue (Kutter & Sulakvelidze, 2005). La méthode des dilutions permet de déterminer de manière plus exacte la concentration de phages présente dans un échantillon. Des dilutions sérielles de l'échantillon de phages initial sont faites allant de 10^{-1} à 10^{-8} . À chaque tube d'agar mou de 4 ml est ajouté 500 uL de la culture bactérienne et 100 uL de la dilution de phages désirée. Le mélange est ensuite déposé sur la gélose TSA et incubé à 37 °C pour 16 à 20 heures. Un décompte des plages de lyse est ensuite fait de manière à déterminer la concentration des phages dans l'échantillon (nombre de plages de lyse x dilution = UFP/ml)

3.4 Analyse de la viabilité des phages en surface

Avant de savoir si un phage peut être utilisé comme agent d'assainissement, il est important de définir son comportement sur les surfaces sèches. Chaque phage a des propriétés différentes et spécifiques et il est possible que certains d'entre eux ne puissent survivre à la déshydratation en surface. Donc, pour sélectionner un phage qui serait utilisé en milieu humide ou sec, il est important de tester l'effet de la déshydratation sur ce dernier. Les bactériophages de *Staphylococcus aureus* utilisés pour cette recherche (phage K et phage P68) ainsi que le phage d'*Escherichia coli* (T4), ont d'abord été testés pour leur viabilité sur les surfaces d'acier inoxydable. Des rondelles d'acier inoxydable médical sont utilisés dans cette expérience et sont déposés dans des boîtes de Pétri de manière à aider à la manipulation de ces derniers. Cent uL de la solution mère de phages (10^8 UFP/ml) a été déposé sur la surface d'acier inoxydable et étendu avec un grattoir cellulaire de manière à bien recouvrir toute l'aire du disque. Les phages ont été laissés à l'air libre sous la hotte à flux laminaire pendant différents intervalles de temps soit entre 5 et 360 minutes. Pour chaque temps d'attente choisi, il y a eu récupération des phages qui étaient encore présents sur la surface à l'aide de 3 ml d'une solution saline physiologique. Un grattoir cellulaire a été utilisé pour frotter sur la surface entière de manière vigoureuse pendant 45 secondes afin de récupérer les phages. La solution de récupération a ensuite été transférée dans un tube de 5 ml et diluée de 10^{-1} jusqu'à 10^{-6} . La méthode de la goutte a permis de déterminer approximativement le degré de viabilité des phages à chaque intervalle de temps et la méthode de dilution a permis de connaître la concentration exacte de phages après chaque temps de séchage.

3.5 Analyse de la viabilité des bactéries en surface

L'objectif ultime de ce projet de recherche est de s'attaquer principalement aux bactéries qui persistent sur les surfaces sèches et qui sont donc plus résistantes et adaptées à des conditions non optimales de viabilité. De manière à pouvoir utiliser ce type de bactérie, il faut déterminer le temps moyen de séchage nécessaire pour pouvoir séparer les bactéries moins résistantes de celles qui ont la capacité de survivre pour de nombreuses heures voire des jours. La façon la plus simple de trouver ces conditions est de prendre un échantillon bactérien ajusté à une concentration connue et de surveiller sa viabilité à travers le temps. Des essais antérieurs ont démontré qu'un échantillon de *S. aureus* ajusté à une absorbance de 0.70 à 600 nm est à une concentration de 2×10^8 UFC/ml (unité formatrice de colonie). À partir de cette information, il est possible de faire une estimation du nombre de bactéries déposées sur la surface à contaminer. Une concentration bactérienne de 2×10^6 UFC/ml est utilisée et 100 µL de cette dilution est étendue sur les surfaces avec un grattoir cellulaire. Aux temps : 60, 120, 180, 240, 300, 360 et 1440 minutes (24 heures), les échantillons sont récupérés en frottant la surface avec 3 ml de NaCl 0,85 % à l'aide d'un grattoir cellulaire. Le liquide est transféré dans les tubes à dilution où des dilutions sériées (10^{-2} à 10^{-8}) sont faites. Un volume de 100 µL des dilutions est ensemencé sur des géloses TSA (en triplicata) et incubé à 37 °C pour 16 à 20 heures. Il est alors possible de compter le nombre de colonies sur les géloses TSA de chaque dilution.

3.6 Tests d'interaction entre les phages et les bactéries sur des surfaces

3.6.1 Essais de turbidité

La technique de la turbidité a été utilisée principalement pour essayer de déterminer l'effet du contact entre les phages et les bactéries en suspension. La simplicité de la technique et sa facilité d'exécution ont motivé son choix. Plusieurs échantillons ont été testés de manière à pouvoir analyser différentes conditions de contact. Trois échantillons de contact ont été faits en contaminant une surface avec *S. aureus* (2×10^4 UFC/ml) et en laissant sécher pour une période de 180 minutes. Ensuite, 3 ml de la suspension de phage concentrée à 10^8 UFP/ml a été mise en contact avec les surfaces contaminées pour différentes périodes de temps (15 minutes, 30 minutes, 60 minutes). Le liquide a ensuite été récupéré et celui-ci a été incubé pour 24 heures. Un contrôle négatif a été fait avec du TSB au lieu de la suspension de phages. Le contrôle positif

était un test en suspension liquide : un échantillon contenant 0,1 ml de solution bactérienne avec 0,5 ml de la solution mère de phages. Finalement, le dernier échantillon était constitué d'une suspension de 3 ml des bactéries ayant été récupérées après le séchage (180 minutes) avec 5 ml de TSB et 2 ml de la solution mère de phages à 10^8 UFP/ml. Cet échantillon est similaire aux trois premiers mis à part pour le fait que le contact phage-bactérie se fait uniquement dans le tube, contrairement aux trois autres où il y a contact initial sur la surface d'acier inoxydable.

3.6.2 Interaction sur milieu humide

Une autre méthode pour vérifier l'interaction entre les phages et les bactéries est faite à l'aide de la plaque agitatrice. Dans le contexte de ce projet de recherche, cette technique a été étudiée brièvement, car elle est faite en suspension et ne servait qu'à prouver l'efficacité des phages comme agents infectieux, mais en omettant le séchage de ceux-ci. La technique utilisée ici a été inspirée par un brevet déposé par la compagnie Nestlé en 2003 (numéro : EP 1533369A1) qui a étudié l'utilisation des phages anti-*Enterobacter sakazakii* comme désinfectant dans le domaine alimentaire. Notre méthode consistait à prendre 5 ml d'un échantillon bactérien ajusté à 0,70 DO₆₀₀, l'ajouter sur l'acier inoxydable (placé dans le fond d'une boîte de Pétri) et l'agiter pendant 60 minutes à basse vitesse. Après 60 minutes, l'acier inoxydable est lavé 3 fois à l'aide d'un tampon de PBS (2g de NaCl, 0,05 g de KCl, 0,445 g de Na₂HPO₄• 2 H₂O et 0,068 g de KH₂PO₄) et les plaques sont mises à sécher pour 180 minutes sous la hotte à flux laminaire. Une suspension de phages à une concentration de 10^8 UFP/ml est préparée et 7 ml de cette suspension est déposée sur les plaques d'acier inoxydable. Pour le contrôle négatif, du bouillon TSB est utilisé à la place de la suspension de phages. Les plaques d'acier inoxydable sont placées sur l'agitateur pour différents intervalles de temps soit 120, 240 ou 360 minutes, selon le protocole utilisé dans le brevet de la compagnie Nestlé. Lorsque le temps d'attente est atteint, l'acier est lavé 3 fois avec le PBS. 3 ml de NaCl 0,85 % est utilisé pour la récupération par grattage et la suspension récupérée est ensuite diluée pour l'ensemencement en triplicata sur les géloses de TSA. Après l'incubation à 37 °C pour 20 heures, il est possible de faire un décompte bactérien des bactéries qui ont survécu au traitement et de prouver l'efficacité des phages sur les surfaces.

3.6.3 Interaction sur un substrat sec

Cette technique est faite de manière similaire aux deux précédentes pour ce qui est de la

contamination des surfaces par les bactéries. La différence porte sur le fait que les phages qui sont déposés sur les surfaces sont eux aussi mis à sécher. Le but était de vérifier l'effet du séchage des deux entités sur leurs interactions. Pour chaque intervalle de temps, plusieurs échantillons ont été utilisés soit du bouillon TSB (contrôle positif et point de comparaison), la suspension de phages pure et des suspensions de phages avec du calcium à différentes concentrations (5 mmol à 20 mmol). Des cofacteurs, comme le calcium, peuvent être utilisés dans les préparations de phages pour augmenter le taux d'adsorption et aider au processus de pénétration de génome du phage dans le cytoplasme bactérien (Chhibber, Kaur, & Kaur, 2014). L'hypothèse que le calcium pourrait aider à l'adhésion des phages aux bactéries a donc été testée dans les mêmes conditions que les autres essais. Cent uL de ces échantillons ont été étalés sur les surfaces maintenant contaminées par l'échantillon bactérien et laissés à sécher pour différents intervalles de temps : 60 minutes et 180 minutes. Dans nos essais de viabilité des bactéries, nous avons vu qu'un temps de séchage d'au moins 60 minutes était nécessaire pour une réduction de 70% des bactéries. Nous voulions tester des conditions similaires aux hôpitaux lorsque des bactéries contaminent une surface et que la majorité meurt en raison du séchage, mais qu'une partie résiste. C'est pourquoi nos manipulations ont majoritairement été faites avec un temps de séchage de minimum 60 minutes. Il est connu que les phages prennent environ 30 minutes pour infecter les bactéries et faire un cycle de réplication donc il est suggéré d'attendre un minimum de 30 minutes avant de pouvoir tester l'efficacité (Kutter & Sulakvelidze, 2005). Après les temps de séchage, les disques sont récupérés à l'aide de solution saline 0,85 % (3 ml) en grattant pendant 45 secondes. Les suspensions récupérées sont diluées avec la technique des dilutions sériées et les échantillons sont ensemencés sur des géloses TSA en triplicata. Les géloses sont ensuite incubées à 37 °C pour 20 heures. Il est alors possible de démontrer l'efficacité des phages sur les surfaces sèches.

3.6.4 Effet de la dilution des phages sur leur efficacité sur les surfaces

Nous avons tenté d'analyser l'effet de la dilution de la suspension de phages sur son efficacité antibactérienne avec la technique décrite en 3.6.3. Les mêmes temps de séchage, soit 60 et 180 minutes ont été étudiés. Ensuite, la solution de phages a été diluée à 10^7 UFP/ml, 10^6 UFP/ml et 10^5 UFP/ml. Cent uL de ces dilutions ont été appliquées sur les échantillons d'acier inoxydable contaminés et un temps contact de 60 minutes a été calculé. La même technique de

récupération a été utilisée (voir 3.4.3) et le décompte bactérien a permis d'analyser l'effet de la dilution des phages sur leur efficacité sur les surfaces.

3.7 Rémanence de l'action des phages

Un autre aspect important à évaluer est la capacité de rémanence des phages, c'est-à-dire, comprendre si les phages ont la capacité de protéger une surface contre une contamination bactérienne éventuelle après l'application de la suspension. La technique utilisée ici a été développée pour les besoins du projet en se basant sur les principes de base de la technique de contact bactérie-phage. La manière la plus simple de tester cette propriété est d'appliquer cent uL d'une suspension de phages à une concentration de 10^9 UFP/ml sur les plaques d'acier inoxydable et de laisser sécher pour différents intervalles de temps. Lorsque le temps de séchage est atteint, il faut déposer 100 uL d'une culture bactérienne ajustée à 0,70 DO₆₀₀ et diluée 10^{-1} . Le temps de contact entre les deux entités microbiologiques est variable soit entre 60 minutes et 24 heures. Ensuite, nous avons récupéré les bactéries avec 3 ml de NaCl 0,85 % et ensemencé sur les géloses TSA. La dernière étape est d'incuber pour 20 heures à 37 °C et faire un compte viable des bactéries qui ont résisté au contact avec les phages.

CHAPITRE 4 RÉSULTATS

4.1 Propriétés des cultures bactériennes

4.1.1 Estimation de la concentration bactérienne

Dans le but d'obtenir des valeurs reproductibles, une estimation de la concentration bactérienne dans un échantillon à une absorbance de 0,70 (DO_{600}) a été faite pour les trois espèces bactériennes (tableau 4.1). Les essais ont été faits plus d'une trentaine de fois pour s'assurer de la validité statistique des valeurs obtenues. Une valeur théorique de la concentration bactérienne à une densité optique (D.O) de 600 nm a été trouvée pour *E. coli* B HER 1024 sur le site internet de « Agilent Genomics ». Cette valeur est de $5,6 \times 10^8$ UFC/ml et on peut voir que la valeur trouvée expérimentalement est plus élevée. Cela pourrait être dû en partie à la différence d'espèce bactérienne précise utilisée dans les deux cas. L'utilisation de différents spectrophotomètres peut aussi engendrer une différence entre les valeurs ainsi que la méthode utilisée pour faire l'estimation.

Tableau 4.1 : Estimation de la concentration bactérienne dans un échantillon avec une absorbance de 0,70 à une densité optique de 600 nm.

	Valeur pratique (UFC/ml)
<i>S. aureus</i> 1049	$4,9 \times 10^7 \pm 4,2 \times 10^7$
<i>S. aureus</i> 1474	$2,9 \times 10^8 \pm 3,5 \times 10^8$
<i>E. coli</i> B 1024	$2,5 \times 10^9 \pm 1,9 \times 10^9$

4.2 Comportement des phages suite au séchage

4.2.1 Analyse de la viabilité des phages suite au séchage

La viabilité des phages a été testée dans un contexte de viabilité dans le temps. Le taux de perte a été calculé de 5 minutes à 360 minutes. Dans le tableau 4.2, on voit qu'il y a une perte d'environ 3 log pendant le temps de séchage sous la hotte à flux laminaire pour le phage K. La perte de viabilité est différente chez les deux espèces de phages. On peut voir qu'elle est beaucoup plus stable et proportionnelle avec le phage K qu'avec le phage T4 (tableau 4.3). Cela est particulièrement visible après 60 minutes alors qu'on a une perte de seulement 1 log avec le

phage K versus 3 log avec le phage T4. Ces données démontrent les particularités de chaque phage et comment des paramètres, comme celui-ci, doivent être vérifiés pour chaque espèce.

Tableau 4.2 : Analyse de la viabilité dans le temps du bactériophage K sur une surface d'acier inoxydable

	Phage K	
	Moyenne technique de la goutte	Moyenne technique du décompte
5 minutes	$7,8 \times 10^6 \pm 4,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8 \pm 7,5 \times 10^7$
60 minutes	$7,0 \times 10^5 \pm 5,2 \times 10^5$	$2,7 \times 10^7 \pm 3,7 \times 10^7$
120 minutes	$5,5 \times 10^4 \pm 6,4 \times 10^4$	$1,7 \times 10^6 \pm 1,8 \times 10^6$
180 minutes	$5,5 \times 10^4 \pm 6,4 \times 10^4$	$1,5 \times 10^6 \pm 7,1 \times 10^5$
360 minutes	10^4	3×10^5

Tableau 4.3 : Analyse de la viabilité dans le temps du phage T4 sur une surface d'acier inoxydable

	Phage T4	
	Moyenne technique de la goutte	Moyenne technique du décompte
5 minutes	$4,0 \times 10^6 \pm 5,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^8 \pm 2,8 \times 10^7$
60 minutes	$1,2 \times 10^5 \pm 5,21 \times 10^4$	$3,2 \times 10^5 \pm 3,5 \times 10^4$
120 minutes	$4,0 \times 10^3 \pm 5,2 \times 10^3$	$4,3 \times 10^4 \pm 4,2 \times 10^3$
180 minutes	$1,0 \times 10^3 \pm 0$	$1,1 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^3$

4.3 Comportement des bactéries suite au séchage

4.3.1 Persistance bactérienne sur les surfaces

Une comparaison de la mortalité des bactéries sur les surfaces d'acier inoxydable a été faite pour pouvoir évaluer le comportement des bactéries (tableau 4.4). On note une perte de viabilité moyenne d'environ 70 % chez les 3 espèces après seulement 60 minutes de séchage. Par contre, comme le démontre la figure 4.1, chez *S. aureus* 1474, la mort cellulaire est plus graduelle, cette souche semble moins affectée par la sécheresse. Dans le cas d' *E. coli* B et de *S.aureus* 1049 après 240 minutes sur la surface, les effets de la sécheresse deviennent plus visibles et la mort cellulaire augmente rapidement entre 240 et 360 minutes. C'est donc après 240

minutes de séchage que la différence se fait particulièrement voir alors qu'il y a une perte de 19 % pour *S. aureus* 1049 entre 240 et 300 minutes (on note une perte de viabilité de 7% pour *S. aureus* 1474 pour la même période de temps). Pour *E. coli* B et *S. aureus* 1049, moins de 3 % des bactéries sont encore viables après 360 minutes alors que 8% sont encore viables pour *S. aureus* 1474.

Tableau 4.4 : Étude du taux de mortalité des bactéries après différentes périodes de séchage sur une surface d'acier inoxydable

Temps	<i>S. aureus</i> 1474		<i>S. aureus</i> 1049		<i>E. coli</i> B 1024	
	%	Log	%	Log	%	Log
60 min	76± 4,95	0,62±0,45	64± 5,66	0,45±0,07	78± 2,83	0,66±0,05
120 min	81± 8,49	0,72±0,20	71±7,07	0,54±0,11	82±4,24	0,73±0,10
180 min	82±4,24	0,79±0,10	78±2,82	0,65±0,55	88±4,24	0,96±0,16
240 min	85±3,53	0,81±0,23	78±1,41	0,67±0,03	90±4,24	1,01±0,19
300 min	85±3,53	0,89±0,10	94±6,36	1,25±0,52	94±2,82	1,24±0,18
360 min	92±1,41	1,08±0,07	97±2,12	1,57±0,43	98±3,53	1,69±0,05
24 heures	99	2	-	-	-	-

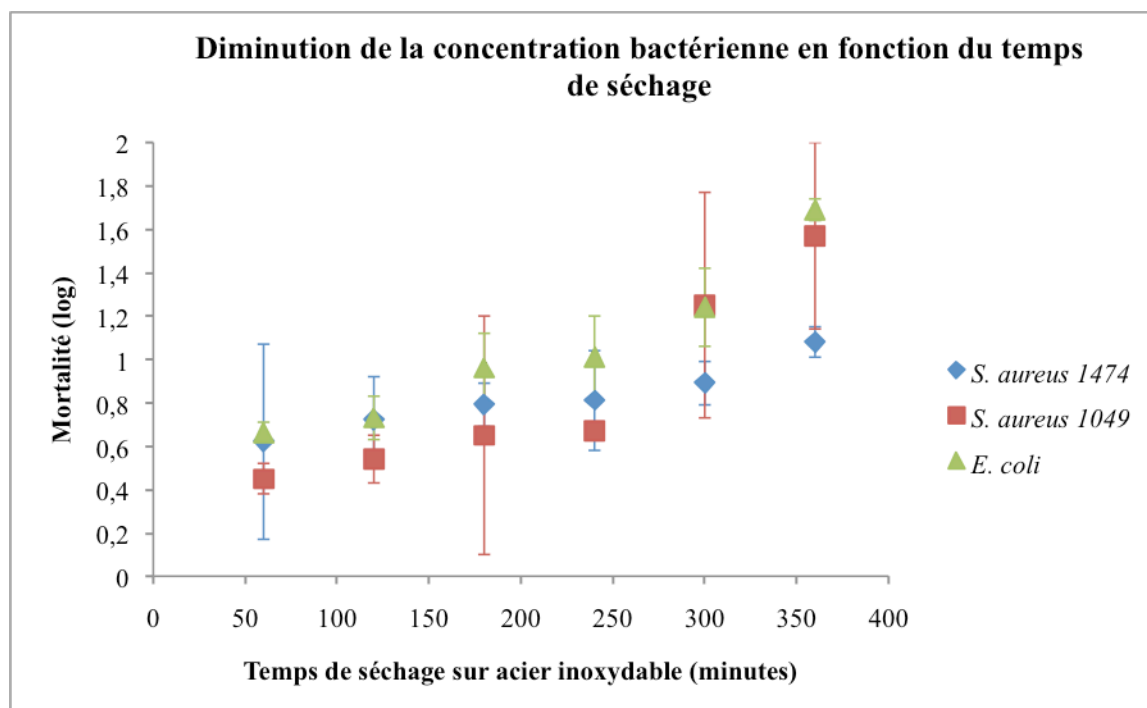


Figure 4.1 : Étude du taux de mortalité de trois souches bactériennes en fonction du temps de séchage sur une surface d'acier inoxydable

4.4 Interaction des phages avec les bactéries

4.4.3 Essais de turbidité

Plusieurs échantillons ont été faits de manière à pouvoir comparer les différentes réactions et valeurs de turbidité suite à un contact phage-bactérie en milieu liquide pour une période de temps de 24 heures. Notre hypothèse est que la turbidité des échantillons bactériens va être influencée par la présence/absence de phages ainsi que par le temps de contact entre les phages et les bactéries. Le tableau 4.5 montre les valeurs de turbidité. On voit une diminution de la valeur d'absorbance lorsque le temps de contact entre les phages et les bactéries augmente, laissant ainsi penser que les phages lysent les bactéries. Un échantillon a été créé pour pouvoir encore prouver que le fait de sécher les bactéries sur une surface n'empêche pas les phages de s'attaquer à ces dernières (aucune mutation ou changement physiologique notable). Les bactéries ont été séchées pendant 180 minutes sur une surface pour ensuite être récupérées et mise en bouillon avec les phages à une concentration de 10^8 UFP/ml.

Tableau 4.5 : Analyse de la turbidité en fonction du temps de contact entre le phage K et *S. aureus* 1474

	24 heures d'incubation à D.O. 600 nm
Contrôle négatif	0,561± 0,020
Contrôle positif en bouillon	0,242± 0,065
Contact de 15 min	0,526± 0,010
Contact de 30 min	0,512± 0,054
Contact de 60 min	0,450± 0,013
Bactéries récupérées après séchage puis contact avec les phages en bouillon	0,421± 0,031

4.4.4 Essais sur acier inoxydable et vérification de l'effet de l'ajout de calcium

De multiples essais de séchage ont été faits sur les surfaces d'acier inoxydable de manière à tester plusieurs conditions possibles ainsi que pour essayer de trouver les conditions optimales d'utilisation. Les tableaux 4.6 et 4.7 montrent les résultats obtenus au cours de ces manipulations. Un des aspects qui a été étudié est la possible nécessité d'ajouter un cofacteur à la suspension de phages pour aider à l'infection des bactéries. Le cofacteur employé dans le cas présent a été le calcium. Ce dernier a été utilisé à différentes concentrations pour voir son effet sur les résultats.

En général, on peut voir que les meilleurs résultats sont obtenus lorsque les phages sont laissés sur les surfaces pour un minimum de 60 minutes. C'est à ce moment que la baisse de 1 log est observée. Le temps de séchage initial ne semble pas être un facteur très influent pour l'efficacité du système, car aucune différence drastique n'a été notée (tableaux 4.6) lorsque les bactéries ont été séchées 60 minutes ou 180 minutes. Finalement, l'ajout de calcium n'a pas semblé influencer l'efficacité du système de manière significative. On note dans le tableau 4.7 une légère augmentation de l'activité des phages lorsqu'il y a ajout de la suspension à 10 mmol de Ca^{2+} pour la souche 1474. Par contre, l'ajout d'une concentration plus forte en calcium (20 mmol) n'améliore pas les résultats pour cette même souche. Pour le *S. aureus* 1049, l'ajout de calcium semble n'avoir aucun effet sur l'efficacité des phages pour lyser les bactéries. On peut conclure que la suspension de calcium ne nuit pas à l'activité des phages, mais ne l'améliore pas significativement non plus dans le cas présent.

Tableau 4.6 : Effets des phages sur la viabilité de *S. aureus* et *E. coli* B après décompte des UFC

	<i>S. aureus</i> 1474	<i>S. aureus</i> 1049	<i>E. coli</i> B 1024
Séchage 60 minutes: contact 60 minutes	1,06 ± 0,40	0,30 ± 0,22	1,80 ± 0,51
Séchage 60 minutes: contact 180 minutes	0,98 ± 0,20	1,05 ± 0,15	1,19 ± 0,45
Séchage 180 minutes: contact 180 minutes	1,21 ± 0,14	1,30 ± 0,19	1,20 ± 0,02

Tableau 4.7 : Effet de l'ajout de calcium sur l'efficacité des phages K et P68 pour l'infection du *S. aureus* 1474 et 1049 après 60 minutes de séchage initial et 180 minutes de contact

	<i>S. aureus</i> 1474	<i>S. aureus</i> 1049
Ca²⁺ [5 mmol]	1,48 ± 0,38	0,60 ± 0,17
Ca²⁺ [10 mmol]	1,42 ± 0,21	N.D.
Ca²⁺ [12 mmol]	1,07 ± 0,12	N.D.
Ca²⁺ [15 mmol]	1,22 ± 0,56	N.D.
Ca²⁺ [20 mmol]	1,18 ± 0,29	1,11 ± 0,25

4.4.5 Effet de la dilution de la suspension de phages sur l'efficacité

La suspension de phages utilisée au cours de la majorité des expériences avait une concentration de 10^8 UFP/ml. Des essais ont été faits pour voir s'il était possible d'arriver à la même réduction de 1 log trouvée précédemment si on utilisait des suspensions concentrées à 10^7 , 10^6 ou même 10^5 UFP/ml. Les tableaux 4.9 et 4.10 démontrent l'effet de la dilution des suspensions de phages K et T4 lorsque les bactéries sont initialement séchées 60 minutes ou 180 minutes et qu'il y a contact avec les phages pour une période de 60 minutes. On note une baisse d'efficacité chez le phage T4 lorsque la concentration de phage diminue alors que les résultats semblent stables pour le phage K même lorsque la suspension utilisée est 100 fois plus diluée que la suspension originale.

Tableau 4.8 : Mesure de l'efficacité des phages suite à une dilution de la suspension, 60 minutes de séchage initial et 60 minutes de contact

	Baisse mesurée en %	Baisse mesurée en fx log
Phage K ND	91 ± 1,7	1,06 ± 0,05
Phage K 1:100	90 ± 1,2	1,01 ± 0,05
Phage T4 ND	92 ± 1,41	1,15 ± 0,11
Phage T4 1:10	88 ± 2,82	1,04 ± 0,08
Phage T4 1:100	75 ± 1,54	0,60 ± 0,04
Phage T4 1:1000	68 ± 2,82	0,50 ± 0,12

Tableau 4.9 : Mesure de l'efficacité des phages suite à une dilution de la suspension, 180 minutes de séchage initial et 60 minutes de contact

	Baisse mesurée en %	Baisse mesurée en fx log
Phage K ND	95 ± 0,71	1,36 ± 0,08
Phage K 1:100	92 ± 1,41	1,11 ± 0,09
Phage T4 ND	94 ± 1,41	1,71 ± 0,04
Phage T4 1:10	89 ± 7,07	1,30 ± 0,16
Phage T4 1:100	76 ± 10,09	0,95 ± 0,37
Phage T4 1:1000	70 ± 5,67	0,68 ± 0,32

4.5 Potentiel de rémanence des bactériophages

L'activité de rémanence d'un produit est définie comme la « capacité d'un produit à assurer une protection désinfectante pendant une certaine période de temps après que ce dernier ait été appliqué » (MSSS, 2009). Nous avons donc tenté de tester les suspensions de phages pour voir si elles avaient une activité de rémanence. Nous avons regardé le potentiel de rémanence des phages après 120 minutes de séchage initial et 60 minutes de contact avec les bactéries (tableau 4.10). Nous avons aussi remarqué qu'après 24 heures de séchage, l'activité des phages est pratiquement nulle et que leur effet antibactérien est très altéré (tableau 4.11).

Tableau 4.10 : Analyse de l'activité antimicrobienne de la suspension de phages suite à une période de séchage (120 minutes) suivi d'un contact avec les bactéries (60 minutes)

	Baisse mesurée en %	Baisse mesurée en fx log
Phages K	88± 1,41	0,98± 0,15
Phages K + 5mmol CaCl₂	72± 0,71	0,55± 0,01
Phages K + 10mmol CaCl₂	92± 2,12	1,10± 0,11
Phages K + 20mmol CaCl₂	90± 0,71	1,00± 0,03
Phages T4	90± 2,12	1,00± 0,09
Phages P68	84± 0,71	0,80± 0,02

Tableau 4.11 : Analyse de l'activité antimicrobienne de la suspension de phages suite à une période de séchage (24 heures) suivi d'un contact avec les bactéries (60 minutes)

	Baisse mesurée en %	Baisse mesurée en fx log
Phages K	15± 2,82	0,07± 0,01
Phages T4	24± 2,82	0,12± 0,02
Phages P68	9± 2,12	0,04± 0,04

4.6 Stabilité des phages

La stabilité du phage T4 de *E. coli* B et celle du phage K de *S. aureus* 1474 ont été testées dans différentes conditions (température et temps) en mesurant leur activité antibactérienne. Les bactériophages sont très stables à 4 °C et ne semblent pas perdre d'activité sur une période de 2 mois. Par contre, on note qu'à température ambiante, il y a une légère baisse dans la concentration bactérienne après 30 jours et une perte de stabilité après 60. Finalement, à 37 °C, la baisse d'activité après deux semaines d'incubation dénote une perte de stabilité dans les deux cas.

CHAPITRE 5 DISCUSSION

Bien qu'une prise de conscience collective se soit faite au cours des dernières années par rapport à la problématique des infections nosocomiales, le problème persiste et des gens sont atteints par des IN sur une base régulière dans les établissements de soins encore aujourd'hui. Il n'y a aucune solution miracle et pour l'instant, l'éducation de la population et la prévention par le lavage des mains et la désinfection, sont les deux moyens les plus efficaces et les moins coûteux pour faire diminuer l'incidence des IN.

La possibilité d'utiliser les bactériophages comme moyen de désinfection est une nouvelle avenue et très peu d'études sont rapportées dans la littérature. Notre projet représente, à notre avis, une voie innovante et prometteuse qui vient aussi avec son lot de difficultés et de questions. L'utilisation de phages comme moyen de décontamination est justifiée par la mission de trouver une nouvelle alternative aux moyens chimiques, souvent toxiques, déjà utilisés présentement. L'emploi de phages spécifiques aux bactéries utilisées a permis de déterminer l'efficacité des phages pour la décontamination de surfaces.

5.1 Analyse des résultats

Le projet s'est échelonné sur plus de 16 mois et il était très important de bien normaliser les manipulations de manière à pouvoir comparer tous les résultats obtenus au cours de la période expérimentale.

Un des premiers paramètres à tester était celui de savoir si nos phages peuvent survivre sur des surfaces et si oui, pour combien de temps. Les phages perdent en moyenne 1 log de viabilité par heure. Après 360 minutes sur une surface d'acier inoxydable, la concentration de phage K est passée de 10^8 UFP/mL à 10^5 UFP/mL (tableau 4.2). Ce paramètre est important à prendre en compte, car il pourrait influencer la fréquence d'application du produit sur les surfaces pour qu'il y ait toujours des phages actifs de manière à garder le niveau de bactéries présentes sous le seuil d'infection.

Pour le phage *E. coli* B, on peut noter une résistance à la sécheresse plus faible qu'avec les phages de *Staphylococcus aureus*. Une diminution de viabilité de 2 log était déjà notée après 60 minutes de séchage (vs 1 log pour *S. aureus*) (tableau 4.3). Comme discuté dans le chapitre 1, plusieurs facteurs peuvent affecter la stabilité des phages en plus de la dessiccation comme la

température, le rayonnement solaire (particulièrement les UV) ainsi que l'exposition aux substances bactéricides, telles que les ions de cuivre ou autres métaux comme l'argent (Iriarte et al., 2007). Ces facteurs chimiques et physiques vont déterminer la viabilité des phages sur les surfaces et peuvent les inactiver en endommageant un des éléments essentiels de leur structure de base (capside, fibre caudale, enveloppe) ou en causant un changement au niveau de la structure de l'ADN (Ackermann et al., 2004). Dans le cadre de ce projet de recherche, ces facteurs n'ont pas été étudiés et ont pu influencer le taux de mortalité des phages sur les surfaces. Il serait intéressant de refaire les expérimentations tout en contrôlant ces paramètres de manière à obtenir une meilleure persistance de nos bactériophages sur les surfaces.

L'étude de la viabilité des bactéries est un autre paramètre majeur à étudier pour l'élaboration de ce projet. En 60 minutes de séchage, *S. aureus* 1474 a un plus grand taux de mortalité (76 %) que *S. aureus* 1049 (64 %) (tableau 4.4). Après 360 minutes de séchage, on note qu'il y a une perte de viabilité de 92 % chez 1474 contre 97 % avec 1049. On peut donc émettre une hypothèse que la plus grande proportion de mortalité bactérienne se fait dans les 60 premières minutes de séchage. En comparant avec *E. coli* B, on voit que chaque espèce bactérienne réagit différemment au séchage. On observe dans la figure 4.1 que la perte de viabilité chez l'espèce de *E. coli* B est plus exponentielle que celle des deux espèces de *S. aureus*. La température et l'humidité peuvent aussi avoir influencé la viabilité des bactéries sur les surfaces (Kramer, Schwebke & Kampf, 2006). Certaines espèces survivent mieux dans des conditions de basse humidité, tel le *S. aureus*, alors que des températures plus faibles (4 °C à 6 °C) favorisent la survie de *E. coli*. Ces deux conditions n'ont pas été contrôlées pendant nos expérimentations (mais ont été gardées assez stables) et pourraient hypothétiquement avoir influencé la viabilité de nos souches sur les surfaces d'acier inoxydable. La durée de persistance varie énormément pour chaque espèce bactérienne dépendamment des conditions dans lesquelles les expérimentations ont été faites. Par exemple, dans la revue de littérature de Kramer et al. (2006), la persistance de *S. aureus* sur les surfaces sèches fluctue entre 7 jours et 7 mois selon les différents articles, alors que pour *E. coli*, des valeurs de 1,5 jours à 16 mois sont répertoriées. Ces valeurs démontrent que les différentes conditions expérimentales influencent la persistance bactérienne sur les surfaces. Nous avons testé la baisse de viabilité bactérienne dans le temps pour trois souches, mais seulement sur une courte période (jusqu'à 360 minutes). Pour ce projet, il n'était pas nécessaire de savoir à quel moment on atteignait la perte de viabilité totale, car nous

voulions seulement nous assurer qu'une partie des bactéries résistait à un séchage de quelques heures. Il pourrait être intéressant de le faire de manière à s'assurer que les souches bactériennes utilisées suivaient la même tendance que ce qui est retrouvé dans la littérature.

Dans la littérature, on remarque qu'il y a beaucoup d'études qui ont été faites en milieu liquide, où les interactions phages-bactéries sont sans doute facilitées. Dans ce projet, le but est de reproduire ce genre d'expérience, mais sur des surfaces sèches (sur des surfaces où les contaminants ont probablement été soumis à une certaine déshydratation). Ce sont des conditions qui sont retrouvées lorsqu'on parle de décontamination. Une étape de séchage des bactéries est nécessaire pour faire nos expériences et il fallait vérifier si les bactéries étaient encore susceptibles aux bactériophages après la période de séchage. En effet, un changement de conformation des bactéries aurait pu se produire, changeant les récepteurs bactériens et ainsi empêcher l'adsorption des phages aux bactéries. Un brevet déposé par Nestlé en 2003 démontre l'efficacité des phages anti-*Enterobacter sakazakii* comme agents antimicrobiens dans les produits alimentaires (Breeuwer, Boissin-Delaporte, Joosten, & Lardeau, 2005). Ils ont noté une perte de 2 log après 120 minutes de contact entre les phages et les bactéries en milieu liquide. Nous nous sommes inspirés de ce protocole expérimental et avons observé une baisse de plus de 1,30 log de la charge bactérienne après 180 minutes de contact phages-bactéries. Nos résultats sont semblables à ceux obtenus par la compagnie Nestlé (baisse de 2 log), malgré certaines différences dans le protocole expérimental. Il est important de noter que leur expérience a été faite dans un système complètement liquide alors que nous avons inclus une période de séchage sur une surface. Cette étape dans nos manipulations était cruciale, car c'est ce qui nous a permis de confirmer que les bactéries ayant subi une période de séchage sont encore susceptibles à l'infection par les phages. Il ne faut pas négliger le fait que nous n'avons pas utilisé la même combinaison bactérie-phage qu'eux, ce qui pourrait aussi expliquer la différence de résultats. Pour expliquer la différence de résultats, nous pourrions aussi proposer l'hypothèse, que même si les bactéries sont susceptibles aux phages après une période de séchage, cette dernière rend peut-être l'infection plus difficile que lorsque les bactéries et les phages sont mis en contact en milieu liquide dès le départ.

Des essais de turbidité ont aussi été faits et les résultats sont présentés dans le tableau 4.5. Ces essais ont été faits pour analyser l'effet de différents paramètres sur la lyse bactérienne. Ces manipulations ont inclus des essais en milieu complètement liquide de manière à pouvoir

comparer l'effet de l'étape de séchage sur l'infection des bactéries par les phages. On observe une nette différence d'absorbance lorsque les phages et les bactéries sont mis en contact en milieu liquide plutôt que lorsqu'une étape de séchage est incluse dans les manipulations. En fait, l'absorbance est pratiquement deux fois plus faible lorsque les bactéries et les phages sont mis en contact en milieu liquide, ce qui laisse présager que la lyse des bactéries est plus efficace. La lyse a comme effet d'empêcher les bactéries de se reproduire, et donc fait diminuer l'absorbance. Ces résultats nous amènent de la nouvelle information qui converge vers notre hypothèse, suite aux manipulations inspirées du brevet de Nestlé, qui propose que quoique les phages puissent être efficaces sur des surfaces sèches, ils le sont plus dans un milieu liquide où l'adsorption du bactériophage à la bactérie se fait plus aisément.

La première technique essayée pour appliquer les phages sur une surface contaminée utilisait comme vecteur une lingette de microfibre pour étendre les phages sur les surfaces infectées. Des lingettes de microfibre stérilisées étaient trempées dans une solution de phages pour ensuite être utilisées pour déposer une fine couche de phages sur les surfaces d'acier inoxydables préalablement contaminées par une charge bactérienne. Un témoin négatif a été fait où la lingette était trempée dans une solution de TSB sans phage. Grâce au contrôle, nous avons pu nous assurer que la diminution de la charge bactérienne était bien due à l'action des phages et non à l'action mécanique de frottement sur la surface. Malheureusement, l'effet bactéricide des phages ne semblait pas être optimal (baisse d'à peine $\frac{1}{2}$ log) c'est pourquoi nous avons changé de protocole.

Les essais les plus importants et les plus significatifs de tout ce projet ont été ceux de contact entre les phages et les bactéries sur la surface d'acier inoxydable médical. La conclusion générale tirée de ces essais, est qu'il est possible de faire diminuer de 1 log complet la charge bactérienne totale sur les surfaces infectées après un minimum de 60 minutes de contact entre la solution de phages et les bactéries. De plus, l'augmentation du temps de contact à 180 minutes entraîne une légère hausse d'efficacité, mais les résultats restent quand même semblables, soit une diminution d'un peu plus d'un log (tableaux 4.6). Un temps de contact de moins de 60 minutes ne permet pas d'atteindre la baisse de 1 log voulue dans le cadre de ces expériences (tableau non disponible). Nous basons notre hypothèse qu'un temps de contact minimal de 60 minutes est nécessaire pour l'infection des bactéries par les phages sur le fait que le temps nécessaire pour que les phages puissent s'attacher aux bactéries est de 30 à 45 minutes (Kutter &

Sulakvelidze, 2005). Si on ne laisse pas assez de temps aux phages pour agir à leur plein potentiel, il est raisonnable de s'attendre à avoir les résultats que nous avons obtenus. Par contre, dans une étude de Soni, Nannapaneni & Hagens (2010), une baisse de 1,6 log a été obtenue après 30 minutes de contact entre le phage P100 et *L. monocytogenes* sur des filets de poisson. On voit ici une efficacité semblable à la nôtre, mais obtenue en moins de temps de contact. Dans une étude de Roy et al. (1993), des phages ont été utilisés pour désinfecter des surfaces d'acier inoxydable infectées par *L. monocytogenes*. Une baisse de 3,7 log a été obtenue après 60 minutes de contact entre les phages et les surfaces contaminées. Finalement, Viazis, Akhtar, Feirtag et Diez-Gonzalez (2010), ont noté une diminution moyenne de 3,34 log de la concentration de *E. coli* sur des surfaces d'acier inoxydable suite à un contact de 60 minutes avec un cocktail de phages à température pièce. Il est intéressant de noter que les auteurs de ces deux dernières études ont réussi à obtenir un meilleur effet bactéricide des phages que nous, et ce avec le même temps de contact. Évidemment, ces expériences ont été faites dans des conditions différentes des nôtres et les variables comme le temps de séchage, le temps de contact, la technique d'application des phages et la technique de récupération des bactéries sont assez distinctes. Ces résultats sont encourageants et démontrent un réel potentiel des phages comme agent bactéricide. Nous pouvons ainsi croire que des résultats similaires pourraient être obtenus avec notre combinaison phage-bactérie, si nous changions quelques paramètres. Il faudrait donc procéder à des nouveaux essais avec nos phages et nos bactéries dans un cadre similaire au leur pour ainsi mieux comparer nos résultats.

Le temps de séchage initial des bactéries ne semble pas affecter l'efficacité du système, car nous avons eu des résultats similaires lorsque les bactéries sont séchées 60 minutes ou 180 minutes (tableau 4.6). Par contre, lorsque les bactéries sont séchées pour plus de 24 heures, les phages ne semblent pas être capables d'infecter les bactéries avec la même efficacité, car la diminution d'un log visée n'est pas obtenue. Est-ce que le temps de séchage prolongé des bactéries influence l'expression des récepteurs présents sur les membranes des bactéries et empêchent ainsi les phages de s'y attacher? Il serait intéressant d'investiguer la question de manière à mieux comprendre l'effet du séchage sur l'expression des récepteurs bactériens.

Aussi, l'ajout d'un cofacteur pour améliorer le taux d'infection des bactéries par les phages a été étudié. Dans ce projet de recherche, la concentration de calcium n'a pas dépassé 20 mmol pour s'assurer d'éviter la précipitation du produit dans la suspension. L'hypothèse que le

calcium pourrait aider à l'adhésion des phages aux bactéries a donc été testée dans les mêmes conditions que les autres essais. Nous avons observé une amélioration du système d'environ $\frac{1}{2}$ log lorsque le calcium est utilisé (10 mmol) (tableau 4.7). Aussi, une autre observation étonnante est que l'ajout d'une concentration de calcium plus élevée (15 mmol, 20 mmol) n'augmente pas automatiquement le taux d'efficacité du système. En effet, un ajout de 10 mmol de calcium a semblé plus bénéfique que l'ajout de 15 mmol ou de 20 mmol de calcium. Les résultats obtenus ne nous permettent pas de dire que l'ajout de calcium soit nécessaire au bon fonctionnement du système, quoi qu'il ne semble pas interférer non plus. Selon un article de Mahony, Tremblay, Labrie, Moineau et van Sinderen (2015), chaque phage peut réagir de façon différente au calcium. Il existe des phages qui dépendent du calcium pour leur efficacité alors que d'autres n'en ont pas besoin du tout. Certains phages de *E. coli*, *B. subtilis* et de différentes espèces de *Lactobacillus*, ne requièrent pas la présence du calcium pour l'étape de l'adsorption à leur bactérie hôte, mais le transfert de l'ADN dans le cytoplasme bactérien se fait de manière moins efficace en son absence. Il est aussi intéressant de noter que les phages ont une excellente capacité d'adaptation et on sait que le magnésium ou le manganèse peuvent remplacer le calcium dans son rôle crucial (Mahony et al., 2015). Compte tenu que le calcium n'a pas semblé jouer de rôle essentiel dans l'augmentation de l'efficacité de nos phages, il est possible de penser que les phages que nous avons utilisés (phage K, phage P68 et phage T4), ne sont pas dépendants du calcium et peuvent bien fonctionner sans lui.

Nous avons aussi testé l'effet de la dilution des suspensions de phages sur leur efficacité. Nous voulions voir si une suspension contenant une concentration un peu plus faible de phages pouvait être aussi efficace. Les résultats pour les échantillons avec le phage K et *S. aureus* 1474 nous ont permis de voir qu'une solution concentrée à 10^6 UFP/ml n'affectait pas l'efficacité du produit et que la baisse de 1 log visée était atteinte (tableau 4.8 et 4.9). Par contre, avec le phage T4, on peut noter un plus grand effet de la dilution, car même lorsque la suspension est diluée seulement par un facteur de 100, l'effet bactéricide du phage est largement diminué. Il est alors important de reconnaître que chaque type de phage va réagir de manière différente aux conditions auxquelles nous le confrontons. Il faut donc bien étudier chaque type de phage pour s'assurer une bonne compréhension de leurs caractéristiques.

Le potentiel de rémanence des phages était une caractéristique intéressante à tester. Le questionnement initial était de savoir si les phages, une fois déposés sur une surface non infectée,

pouvaient protéger la surface d'une future colonisation bactérienne, et si oui, dans quelle mesure. Si les phages ont cette capacité, ce serait un avantage énorme pour le produit développé. Chez le phage K, on a trouvé qu'il semblait y avoir en effet un potentiel de rémanence de la solution de phages, car même 120 minutes après l'application initiale, on voit une diminution de 1 log de la charge bactérienne initiale (tableau 4.10). Chez le phage P68, la diminution d'un log est retrouvée seulement après 60 minutes de séchage (données non disponibles). Le potentiel de rémanence du phage T4 semble meilleur que celui de phage K. En effet, après 360 minutes de séchage, la diminution de 1 log de la charge bactérienne est toujours présente et stable (tableau non disponible). On peut conclure qu'il semble y avoir un potentiel de rémanence, mais ce, seulement pour une courte période de temps.

5.2 Limites

Ce projet de recherche nous a permis d'analyser le comportement des phages et des bactéries sur les surfaces, ainsi que leur interaction. La baisse de 1 log que nous avons obtenue sous différentes conditions expérimentales est non négligeable, mais nous amène à nous demander comment il serait possible d'optimiser le système de manière à obtenir une diminution plus importante de la contamination bactérienne sur les surfaces grâce aux phages. Étant pionnier dans le domaine de l'utilisation des bactériophages pour l'assainissement de surface, ce projet de recherche nous a amené l'information nécessaire sur laquelle se baser pour proposer des améliorations. Plusieurs points restent à éclaircir pour faire avancer la recherche. Par exemple, est-ce que la concentration de phages au départ était suffisante? Même si les phages sont capables d'infecter les bactéries qui ont été séchées, est-ce que la dessiccation altère les récepteurs bactériens et empêche une infection optimale? Est-ce que les conditions dans lesquelles nos bactéries et nos phages ont été testés influencent leur stabilité? Serait-il possible d'améliorer ces conditions? Est-ce que notre technique d'étalement des phages est la meilleure? Est-ce que la technique de récupération des bactéries pourrait être améliorée? Est-ce que la présence de matière organique sur les surfaces pourrait influencer la survie des phages? Finalement, est-ce que le type de surface sur lequel les expérimentations ont été faites a influencé les résultats? Il est primordial de faire plus de recherche en ce sens pour amener des réponses à ces questions.

5.3 Applications visées et études futures

L'objectif général de ce projet de recherche était de sonder la faisabilité de l'utilisation des phages comme méthode d'assainissement des surfaces. Avant de pouvoir développer un produit à commercialiser, il fallait commencer par analyser le comportement des phages et des bactéries sur les surfaces, ainsi que leur interaction, et c'est ce que nous avons accompli.

Le comportement des phages sur les surfaces a rarement été étudié en profondeur jusqu'à présent et il y a un manque d'information sur le sujet. L'étape initiale de cette étude a donc comporté beaucoup plus de défis que prévu et a ralenti le rythme du projet. Maintenant que deux principes essentiels sont connus soit que 1) certains phages ont la capacité de survivre sur les surfaces sèches pour des périodes de temps prolongées et 2) que ces mêmes phages sont capables d'infecter des bactéries sur des surfaces d'acier inoxydable, plusieurs autres étapes d'analyse devront s'ensuivre pour pouvoir optimiser cette technique et pouvoir la commercialiser.

Comme mentionné auparavant, le taux de désinfection par les phages sur les surfaces sèches, quoi que correct, n'est pas optimal. Il faut une diminution de la contamination bactérienne d'au moins 3 log de manière à pouvoir considérer un produit comme un désinfectant alors qu'une baisse de 5 log est nécessaire pour parler de stérilisation (MSSS, 2006; Sattar, 2010). La diminution moyenne de 91 % trouvée dans ce projet, soit 1 log, ne ferait du produit qu'un assainisseur de surface. Une autre avenue serait aussi d'utiliser des phages modifiés. De plus en plus de recherche est faite en ce sens, de manière à développer des phages plus résistants et plus efficaces. Il serait intéressant d'investiguer ce qui a été fait dans le domaine et voir s'il y aurait possibilité d'augmenter l'efficacité de la technique de cette façon.

Une autre question à se poser et à étudier est la façon dont la solution sera appliquée. Pour l'instant, dans les essais de ce projet, la solution de phages était étendue à l'aide d'un grattoir cellulaire, mais il existe peut-être un moyen plus simple et efficace pour appliquer le produit tout en gardant son efficacité. Par contre, toute la réglementation dans le milieu hospitalier devra être prise en considération, car il existe plusieurs contraintes qui pourraient influencer le choix d'application du produit. Ce genre de règle devra être étudiée pour pouvoir trouver la meilleure technique d'application.

Présentement dans les hôpitaux, des désinfectants chimiques (ammonium quaternaires, hypochlorite de sodium, agents oxydants etc.) sont utilisés pour traiter les surfaces. Il pourrait

être intéressant de vérifier si certains de ces produits pourraient désactiver les phages. Selon le mémoire d'Annie Martineau (2009), certains désinfectants ont, en effet, le pouvoir de désactiver les phages alors que d'autres n'ont que très peu ou pas d'effet sur ces derniers. Il serait alors nécessaire de tester l'effet de ces désinfectants sur les phages qui seront utilisés pour de futurs essais.

Finalement, la question de la pertinence d'un traitement de surfaces à base de phages est importante à aborder. Présentement, il existe des désinfectants chimiques qui sont efficaces contre les bactéries présentes sur les surfaces et qui agissent en moins de 10 minutes alors que notre traitement à base de phages nécessite un temps d'action beaucoup plus long. Il faut se rappeler que certaines bactéries réussissent à développer une résistance contre les traitements déjà utilisés et qu'une approche avec les phages diminuerait cette probabilité de résistance. De plus, il n'y a pas de toxicité associée à l'utilisation des phages contrairement aux produits chimiques utilisés présentement. Aussi, il serait possible de penser qu'un effet collatéral de l'utilisation des phages sur les surfaces pour la prévention des IN est que ces mêmes phages pourraient être ingérés par les patients suite à un contact avec les surfaces. Si ces patients étaient infectés par une bactérie responsable d'une IN, il pourrait y avoir un effet antibactérien des phages qui empêcherait les patients de développer les infections. Évidemment, ceci n'est qu'une hypothèse, mais il serait très intéressant d'investiguer les effets collatéraux de l'utilisation des phages sur les surfaces.

5.4 Conclusion

L'utilisation de phages comme agent de traitement des surfaces ne fait pas encore partie des techniques les plus étudiées, mais ce projet de recherche a pu prouver le potentiel qu'ont les phages comme futur traitement de surface. Les méthodes utilisées présentement semblent pouvoir contenir le taux d'infections nosocomiales dans les établissements de soins. Par contre, il est temps que de nouvelles méthodes plus efficaces soient développées et utilisées. Pour l'instant, selon les résultats que nous avons obtenus, il est impossible de conclure que l'utilisation des phages peut répondre aux exigences du milieu hospitalier pour la désinfection de l'environnement contaminé. C'est pourquoi la recherche sur les phages et leurs multiples utilisations doit continuer.

En plus de poursuivre les expérimentations sur l'utilisation des bactériophages comme agent assainisseur de surface, les études sur la phagothérapie devraient être reprises de manière à améliorer les soins pour les personnes infectées avec une bactérie résistante aux antibiotiques. La thérapie n'est pas un remplacement aux antibiotiques, mais bien un allié qui pourrait réussir là où les antibiotiques échouent. Les propriétés des bactériophages telles que leur capacité à se multiplier rapidement aux sites d'infection et leurs coûts de production peu élevés sont des avantages majeurs pour l'utilisation de ces derniers.

L'utilisation des bactériophages dans le milieu agro-alimentaire devrait promouvoir les avantages à travailler avec ces entités biologiques et peut-être encourager les chercheurs à étudier les potentielles applications des phages pour gagner la guerre contre les bactéries résistantes aux antibiotiques. Dans une société où les infections bactériennes sont de plus en plus difficiles à traiter, les bactériophages offrent une possibilité de traitement bioinspiré et d'application qui pourrait améliorer la qualité de vie de millions de personnes chaque année.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M. Y., Dean, T., Senecal, A., & Sulakvelidze, A. (2008). Bacteriophage Reduce Experimental Contamination of Hard Surfaces, Tomato, Spinach, Brocoli, and Ground Beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 6230-6238.
2. Ackermann HW, Tremblay D, Moineau S (2004) Long-term bacteriophage preservation. *WFCC Newslett* 38, 35–40
3. Adhya, S., Merrill, C. R., & Biswas, B. (2014). Therapeutic and prophylactic applications of bacteriophage components in modern medicine. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(1), a012518.
4. American Meat Institute (2011). Quaternary ammonium compounds: The basics. Tiré de <https://www.meatinstitute.org/index.php?ht=a/GetDocumentAction/i/52186>
5. Association des Victimes d'Infections Nosocomiales ADVIN. (2008). Association pour la défense des victimes d'infections nosocomiales. Tiré de www.advin.org
6. Agence de la santé publique du Canada. (2011). Fiches techniques santé-sécurité: agents pathogènes, et évaluation des risques. Tiré de <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/index-fra.php>
7. Agence de la santé publique du Canada. (2015). Système canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens – rapport de 2015. Tiré de <http://canadiensensante.gc.ca/alt/pdf/publications/drugs-products-medicaments-produits/antibiotic-resistance-antibiotique/antimicrobial-surveillance-antimicrobioresistance-fra.pdf>
8. Alisky, J., Iczkowski, K., Rapoport, A., & Troitsky, N. (1998). Bacteriophages Show Promise as Antimicrobial Agents. *Journal of Infection*, 36, 5-15.
9. Alper, T. (1954). The Inactivation of Free Bacteriophage by Irridiation and by Chemical Agents. *J.gen. Microbiol.*, 11, 313-324.
10. Atterbury, R. J., Connerton, P. L., Dodd, C. E., Rees, C. E., & Connerton, I. F. (2003). Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Applied and environmental microbiology*, 69(10), 6302-6306.
11. Azeredo, J., & Sutherland, I. W. (2008). The Use of Phages for the Removal of Infectious Biofilms. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9, 261-266.
12. Azizian, R., Nasab, S. D. M., & Ahmadi, N. A. (2013). Bacteriophage as a Novel Antibacterial Agent in Industry and Medicine. *Journal of Paramedical Sciences*, 4(4).
13. Barrow, P. A., Lovell, M., & Berchieri Jr., A. (1998). Use of Lytic Bacteriophage for Control of Experimental *Escherichia coli* Septicemia and Meningitis in Chickens and Calves. *Clinical and Vaccine Immunology*, 5(3), 294-298.
14. Barrow, P. A., & Soothill, J. S. (1997). Bacteriophage Therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends in Microbiology*, 5(7), 268-271.

15. Bigwood, T., Hudson, J. A., Billington, C., Carey-Smith, G. V., & Heinemann, J. A. (2008). Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiology*, 25(2), 400-406.
16. Boyce, J. M. (2007). Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *Journal of Hospital Infection*, 65(S2), 50-54.
17. Breeuwer, P., Boissin-Delaporte, C., Joosten, H., & Lardeau, A. (2011). *Brevet européen No. EP 1533369*. Vevey, Suisse: European Patent Register.
18. Carlton, R. M. (1999). Phage Therapy: Past History and Future Prospects. *Archivum Immunologiae at Therapiae Experimentalis*, 47, 267-274.
19. Ceyssens, P.-J., & Lavigne, R. (2010). Introduction to bacteriophage biology and diversity. In P. M. Sabour & M. W. Griffiths (Eds.), *Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens* (pp. 364). Washington, DC: ASM Press.
20. Chan, B. K., Abedon, S. T., & Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future microbiology*, 8(6), 769-783.
21. Chhibber, S., Kaur, T., & Kaur, S. (2014). Essential role of calcium in the infection process of broad-spectrum methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteriophage. *Journal of basic microbiology*, 54(8), 775-780.
22. Curtis, L. T. (2008). Prevention of hospital-acquired infections: review of non-pharmacological interventions. *Journal of Hospital Infection*, 69, 204-219.
23. Dancer, S. J. (1999). Mopping up hospital infection. *Journal of Hospital Infection*, 43, 85-100.
24. Dancer, S. J. (2004). How do we assess hospital cleaning? A proposal for microbiological standards for surface hygiene in hospitals. *Journal of Hospital Infection*, 56, 10-15.
25. Dancer, S. J. (2008). Importance of the environment in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition: the case for hospital cleaning. *Lancet Infect Dis*, 8, 101-113.
26. Dancer, S. J. (2009). The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. *Journal of Hospital Infection*, 73, 378-383.
27. Dancer, S. J. (2014). Controlling Hospital-Acquired Infection: Focus on the Role of the Environment and New Technologies for Decontamination. *Clinical microbiology reviews*, 27(4), 665-690.
28. Dettenkofer, M., Wenzler, S., Amthor, S., Antes, G., Motschall, E., & Daschner, F. D. (2004). Does disinfection of environmental surfaces influence nosocomial infection rates? A systematic review. *AJIC*, 32(2), 84-89.
29. Donlan, R. M. (2009). Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in Microbiology*, 17, 66-71.
30. Ecolyse inc. (2015). *Bactériophage et ses principales composantes* [Illustration]. Tiré de <http://ecolyse.com/bacteriophage/>
31. European Centre for Disease Prevention and Control. (2013). Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Tiré de <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>
32. Falagas, M. E., & Makris, G. C. (2009). Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis. *Journal of Hospital Infection*, 71, 301-306.

33. Falagas, M. E., Thomaidis, P. C., Kotsantis, I. K., Sgouros, K., Samonis, G., & Karageorgopoulos, D. E. (2011). Airborne hydrogen peroxide for disinfection of the hospital environment and infection control: a systematic review. *Journal of Hospital Infection*, 78, 171-177.
34. Fortier, L.-C., & Moineau, S. (2009). Phage Production and Maintenance of Stocks, Including Expected Stock Lifetime. In M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski (Eds.), *Bacteriophages: Methods and Protocols* (Vol. 501, pp. 203-219).
35. Gandham, P. (2015). Bacteriophages: their use in the treatment of infections in the future. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 4(2), 897-879.
36. Golkar, Z., Bagasra, O., & Pace, D. G. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(02), 129-136.
37. Goode, D., Allen, V. M., & Barrow, P. A. (2003). Reduction of experimental Salmonella and Campylobacter contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 5032-5036.
38. Gordon, R. J., & Lowy, F. D. (2008). Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis*(46), S350-S359.
39. Gould, I. M. (2006). Costs of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its control. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28(379-384), 379.
40. Greer, G. G., & Diltz, B. D. (2002). Control of *Brochothrix thermosphacta* spoilage of pork adipose tissue using bacteriophages. *Journal of Food Protection*®, 65(5), 861-863.
41. Guenther, S., Huwler, D., Richard, S., & Loessner, M. J. (2009). Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Read-To-Eat Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 93-100.
42. Hagens, S., & Loessner, M. J. (2007). Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
43. Henderson, D. K. (2006). Managing methicillin-resistant staphylococci: A paradigm for preventing nosocomial transmission of resistant organisms. *American Journal of Infection Control*, 34(5 (supplement 1)), S46-S54.
44. Hota, B. (2004). Contamination, Disinfection, and Cross-Colonization: Are Hospital Surfaces Reservoirs for Nosocomial Infection? *Healthcare Epidemiology*, 39, 1182-1189.
45. Hosseini, Z., Olsson, A. L., & Tufenkji, N. (2014). Going viral: Designing bioactive surfaces with bacteriophage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 124, 2-16.
46. Humphreys, H. (2008). Can we do better in controlling and preventing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the intensive care unit (ICU)? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 27, 409-413.
47. Inal, J. M. (2003). Phage Therapy: a Reappraisal of Bacteriophages as Antibiotics. *Archivum Immunologiae at Therapiae Experimentalis*, 51, 237-244.
48. Institut National de Santé Publique du Québec. (2006). Mesures de prévention et de contrôle des infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) au Québec. Tiré de <https://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/489-MesuresPreventionControleSARM.pdf>

49. Institut National de Santé Publique du Québec. (2013). Mesures de prévention et contrôle des infections à l'urgence. Tiré de https://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/1742_MesPrevContrInfectUrgence.pdf
50. Iriarte, F. B., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, L. M., Wilson, M., & Jones, J. B. (2007). Factors Affecting Survival of Bacteriophage on Tomato Leaf Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1704-1711.
51. Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia microbiologica*, 56(3), 191-200.
52. Jones, J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F. B., & Momol, M. T. (2007). Bacteriophages for Plant and Disease Control. *Annual Review of Pathology*, 45, 245-262.
53. Keary, R., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2013). Bacteriophages and their endolysins for control of pathogenic bacteria.
54. Klemm, P., Munk Vejborg, R., & Hancock, V. (2010). Prevention of bacterial adhesion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88, 451-459.
55. Knoll, B. M., & Mylonakis, E. (2014). Antibacterial bioagents based on principles of bacteriophage biology: an overview. *Clinical infectious diseases*, 58(4), 528-534.
56. Kramer, A., Schwebke, I., & Kampf, G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*(6), 130-138.
57. Kutter, E., De Vos, D., Gvasalia, G., Alavidze, Z., Gogokhia, L., Kuhl, S., & Abedon, S. T. (2010). Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1), 69-86.
58. Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (2005). *BACTERIOPHAGES Biology and Applications*: CRC Press.
59. Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317-327.
60. Lu, T. K., & Collins, J. J. (2007). Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11197-11202.
61. Ly-Chatain, M. H. (2014). The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in microbiology*, 5.
62. Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, R. P., & Van Sinderen, D. (2011). Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 157-163.
63. Mahony, J., Tremblay, D. M., Labrie, S. J., Moineau, S., & van Sinderen, D. (2015). Investigating the requirement for calcium during lactococcal phage infection. *International journal of food microbiology*, 201, 47-51.
64. Mann, N. H. (2008). The potential of phages to prevent MRSA infections. *Research in Microbiology*, 159, 400-405.
65. Mao, J. Y., Belcher, A. M., & Van Vliet, K. J. (2010). Genetically Engineered Phage Fibers and Coatings for Antibacterial Applications. *Advanced Functional Materials*, 20, 209-214.
66. Martineau, A. (2009). *Isolement et caractérisation de bactériophages comme moyen de lutte naturel contre les infections nosocomiales*. (Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, Montréal, QC). Tiré de <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/4705>

67. Masago, Y., Shibata, T., & Rose, J. B. (2008). Bacteriophage P22 and *Staphylococcus aureus* Attenuation on Nonporous Fomites as Determined by Plate Assay and Quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 5838-5840.
68. Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., et al. (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother*, 11, 211-219.
69. McBryde, E. S., Bradley, L. C., Whitby, M., & McElwain, D. L. S. (2004). An investigation of contact transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection*, 58, 104-108.
70. Merabishvili, M., Vervaet, C., Pirnay, J. P., De Vos, D., Verbeken, G., Mast, J., ... & Vanechoutte, M. (2013). Stability of *Staphylococcus aureus* phage ISP after freeze-drying (lyophilization). *PloS one*, 8(7), e68797.
71. Miedzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S, Szufnarowski K, et al. (2012). Clinical aspects of phage therapy. *Adv Virus Res*, 83, 73-121
72. Monk, A. B., Rees, C. D., Barrow, P., Hagens, S., & Harper, D. R. (2010). Bacteriophage applications: where are we now?. *Letters in applied microbiology*, 51(4), 363-369.
73. Ministère de la Santé et des Services Sociaux. (2005). D'abord ne pas nuire... Les infections nosocomiales au Québec, un problème majeur de santé, une priorité. Tiré de <http://publications.msss.gouv.qc.ca/acrobat/f/documentation/2005/05-209-01web.pdf>
74. Ministère de la Santé et des Services Sociaux. (2006). Lignes directrices en hygiène et salubrité. Tiré de <http://publications.msss.gouv.qc.ca/acrobat/f/documentation/2006/06-602-01.pdf>
75. Ministère de la Santé et des Services Sociaux. (2009). Désinfectants et désinfection en hygiène et salubrité: principes fondamentaux. Tiré de <http://publications.msss.gouv.qc.ca/acrobat/f/documentation/2009/09-209-03F.pdf>
76. Ministère de la Santé et des Services Sociaux. (2012). Le Québec et les infections nosocomiales. Tiré de http://www.msss.gouv.qc.ca/sujets/prob_sante/nosocomiales/index.php?situation
77. Ministère de la Santé et des Services Sociaux. (2013). Prévention et contrôle des infections nosocomiales. Tiré de <http://publications.msss.gouv.qc.ca/acrobat/f/documentation/2010/10-209-04.pdf>
78. Mulberry, G. K. (1994). *Current Methods of Testing Desinfectants*. Paper presented at the Chemical Germicides in Health Care International Symposium, Cincinnati, Ohio.
79. Nestlé Corporation. (2013). Antibacterial Treatment Against Diarrhea in Oral Rehydration Solution. Tiré de <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00937274>
80. O'Flaherty, S., Ross, R. P., & Coffey, A. (2009). Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 33(4), 801-819.
81. Otter, J. A., Yezli, S., Salkeld, J. A., & French, G. L. (2013). Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *American journal of infection control*, 41(5), S6-S11.

82. Organisation mondiale de la santé. (2008). Prévention des infections nosocomiales Guide pratique 2e édition. Tiré de http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.12fr.pdf
83. Örmälä, A. M., & Jalasvuori, M. (2013). Phage therapy: Should bacterial resistance to phages be a concern, even in the long run?. *Bacteriophage*, 3(1).
84. Pisiri, A. (2000). Phage Therapy - advantages over antibiotics? *The Lancet*, 356(9239), 1418.
85. Piskin, N., Celebi, G., Kulah, C., Mengeloglu, Z., & Yumusak, M. (2011). Activity of a dry mist-generated hydrogen peroxide disinfection system against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*. *American Journal of Infection Control*, 39(9), 757-762.
86. Proença, D., Leandro, C., Garcia, M., Pimentel, M., & São-José, C. (2015). EC300: a phage-based, bacteriolysin-like protein with enhanced antibacterial activity against *Enterococcus faecalis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(12), 5137-5149.
87. Qadir, M. I. (2015). Phage therapy: A modern tool to control bacterial infections. *Pak. J. Pharm. Sci*, 28(1), 265-270.
88. Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Dey, E. S., & Novik, G. I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol. J. Microbiol*, 59(3), 145-55.
89. Rampling, A., Wiseman, S., David, L., Hyett, A., Walbridge, A., Payne, G., et al. (2001). Evidence that hospital hygiene is important in the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection*, 49(2), 109-116.
90. Rosner, A. J., Becker, D. L., Wong, A. H., Miller, E., & Conly, J. M. (2004). The costs and consequences of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection treatments in Canada. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 15(4), 213-220.
91. Rossmann, M. G., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F., & Leiman, P. G. (2004). The bacteriophage T4 DNA injection machine. *Current opinion in structural biology*, 14(2), 171-180.
92. Roy, B., Ackermann, H. W., Pandian, S., Picard, G., & Goulet, J. (1993). Biological inactivation of adhering *Listeria monocytogenes* by listeriaphages and a quaternary ammonium compound. *Applied and environmental microbiology*, 59(9), 2914-2917
93. Salgado, C. D., Sepkowitz, K. A., John, J. F., Cantey, J. R., Attaway, H. H., Freeman, K. D., ... & Schmidt, M. G. (2013). Copper surfaces reduce the rate of healthcare-acquired infections in the intensive care unit. *Infection Control*, 34(05), 479-486.
94. Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., & Moineau, S. (2013). Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 675-687.
95. Sangster, W., Hegarty, J. P., & Stewart, D. B. (2015). Phage tail-like particles kill *Clostridium difficile* and represent an alternative to conventional antibiotics. *Surgery*, 157(1), 96-103.
96. Sattar, S. A. (2010). Promises and pitfalls of recent advances in chemical means of preventing the spread of nosocomial infections by environmental surfaces. *American Journal of Infection Control*, 38(5), S34-S40.
97. Sattar, S. A., & Springthorpe, S. V. (1994). *Methods under Development for Evaluating the*

- Antimicrobial Activity of Chemical Germicides*. Paper presented at the Chemical Germicides in Health Care International Symposium, Cincinnati, Ohio.
98. Sexton, J. D., Tanner, B. D., Maxwell, S. L., & Gerba, C. P. (2011). Reduction in the microbial load on high-touch surfaces in hospital rooms by treatment with a portable saturated steam vapor disinfection system. *American Journal of Infection Control*, 39(8), 655-662.
 99. Sharp, R. (2001). Bacteriophages: biology and history. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76, 667-672.
 100. Simor, A. E. (2001). Containing MRSA: Surveillance, control, and treatment methods. *Postgrad Med*, 110, 43-48.
 101. Smith, D. L., Gillanders, S., Holah, J. T., & Gush, C. (2011). Assessing the efficacy of different microfibre cloths at removing surface micro-organisms associated with healthcare-associated infections. *Journal of Hospital Infection*, 78(3), 182-186.
 102. Song, J., Kong, H., & Jang, J. (2011). Bacterial adhesion inhibition of the quaternary ammonium functionalized silica nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82, 651-656.
 103. Song, L., Wu, J., & Xi, C. (2012). Biofilms on environmental surfaces: Evaluation of the disinfection efficacy of a novel steam vapor system. *American Journal of Infection Control*, 1-5.
 104. Soni, K. A., Nannapaneni, R., & Hagens, S. (2010). Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish fillets by bacteriophage Listex P100. *Foodborne pathogens and disease*, 7(4), 427-434.
 105. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. G. J. (2001). Bacteriophage Therapy. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, 45, 649-659.
 106. Sulakvelidze, A., & Pasternack, G. R. (2010). Industrial and Regulatory issues in bacteriophage applications in food production and processing. In P. M. Sabour & M. W. Griffiths (Eds.), *Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens* (pp. 364). Washington, DC: ASM Press.
 107. Tomat, D., Migliore, L., Aquili, V., Quiberoni, A., & Balagué, C. (2013). Phage biocontrol of enteropathogenic and shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat products. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3.
 108. University, I. S. (2012). Bacteria Get Viruses too.
 109. Vandini, A., Temmerman, R., Frabetti, A., Caselli, E., Antonioli, P., Balboni, P. G., ... & Mazzacane, S. (2014). Hard surface biocontrol in hospitals using microbial-based cleaning products. *PloS one*, 9(9), e108598.
 110. Varghese, S., Elfakhri, S., Sheel, D. W., Sheel, P., Bolton, F. J., & Foster, H. A. (2013). Novel antibacterial silver-silica surface coatings prepared by chemical vapour deposition for infection control. *Journal of applied microbiology*, 115(5), 1107-1116.
 111. Vasickova, P., Pavlik, I., Verani, M., & Carducci, A. (2010). Issues Concerning Survival of Viruses on Surfaces. *Food Environ Virol*, 2, 24-34.
 112. Verron, Brigitte. (2015). *Cycle lytique et cycle lysogénique des bactériophages*. [Illustration]. Tiré de <http://www.microbiologie-medicale.fr/virologie/untitled39.jpg>

113. Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., & Diez-Gonzalez, F. (2011). Reduction of *Escherichia coli* 0157:H7 viability on hard surfaces by treatment with bacteriophage mixture. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 37-42.
114. Waldor, M. K., Friedman, D. I., & Adhya, S. L. (2005). *Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology*. Washington, DC
115. Wittebole, X., De Roock, S., & Opal, S. M. (2014). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5(1), 226-235.
116. Zeraik, A. E., & Nitschke, M. (2010). Biosurfactants as Agents to Reduce Adhesion of Pathogenic Bacteria to Polystyrene Surfaces: Effect of Temperature and Hydrophobicity. *Current Microbiology*, 61, 554-55